UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1960-1961 N° 812

CONTRÔLE ET STANDARDISATION D'EXTRAITS BIOGÈNES D'ORIGINE ANIMALE

(Stimulines biogènes selon FILATOV)

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 20 juin 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

RETO ILLIEN
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550001_0047

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1960-1961 N° 812

CONTRÔLE ET STANDARDISATION D'EXTRAITS BIOGÈNES D'ORIGINE ANIMALE

(Stimulines biogènes selon FILATOV)

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 20 juin 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

RETO ILLIEN
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. DUQUÉNOIS, *Doyen*, ✻, I. ✪, ⚷
GAZET DU CHATELIER, *Assesseur*, I. ✪
CLADY, *Secrétaire*, I. ✪

DOYEN HONORAIRE :

M. VOLMAR O. ✻, C. ✪

PROFESSEURS :

MM.	LAPP, ✻, I. ✪	Physique
	SARTORY, O. ✻, I. ✪, O. ⚷	Bactériologie
	CORDIER, ✻, I. ✪	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS, ✻, I. ✪, ⚷	Matière médicale
	JAEGER, I. ✪, ⚷	Botanique
	GAZET DU CHATELIER, I. ✪	Pharmacie galénique
	HASSELMANN, I. ✪	Chimie analytique
	SCHREIBER, I. ✪	Chimie organique
	EBEL, ✻, ⚷ I. ✪	Chimie biologique

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	LEDOUX, ⚷, ✪		Sciences naturelles
	MÉTAIS	.....	Sciences appliquées
	MALGRAS (chargés des fonctions)	.....	Sciences naturelles
	LAUSTRIAT	.....	Sciences physico-chimiques

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :

M. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	LAPP	Acoustique
	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Chimie minérale
	SCHREIBER	Chimie générale
	EBEL	Biochimie analyt. et séméiolog.
	LAVIGNE	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et techn.
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Éléments de mathématiques
	C. MEYER	Comptabilité et fiscalité pharmaceutiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

M.	MALGRAS		Bactériologie
Mme	KRISTENSEN		Chimie pharmaceutique
MM.	LAUSTRIAT		Chimie et Physique
	MATHIS	.....	Chimie
	CARBIENER (chargés des fonctions)		Histoire naturelle
	STAHL	.....	Bactériologie et Parasitologie

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur Ch. LAPP

Professeur de Physique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MEYER

Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A mes Parents,

faible témoignage de ma reconnaissance.

A ma Femme,

avec tout mon amour.

INTRODUCTION

En s'inspirant des travaux de SCHOPFER (1) et de ses élèves, démontrant que la *Thiamine pure cristallisée* joue un rôle essentiel comme facteur de croissance indispensable au développement d'une *Mucoracée : Phycomyces blackesleanus*, BURLET, MEYER et FAUDI (2) ont effectué des essais à l'aide d'un grand nombre de microorganismes pour trouver éventuellement un test microbiologique permettant la mise en évidence et le dosage des facteurs désignés actuellement sous le terme de « *Biostimulines* » créé par FILATOV (3) en 1933.

DELAUNOY (4) a défini ces facteurs de la façon suivante : « *Les tissus d'origine animale ou végétale séparés de l'organisme et soumis à de basses températures acquièrent de nouvelles potentialités biologiques. Ils développent des substances de nature encore inconnue, mais douées d'un remarquable pouvoir stimulant sur les processus de défense et de régénération de l'organisme* ».

La genèse et le mode d'action de *ces stimulants biogènes* restent encore incertains; si on leur connaît un certain nombre de propriétés physico-chimiques, on ne possède, en dehors des tests cliniques et biologiques, aucune donnée précise sur leur constitution chimique, ni aucune réaction rigoureuse permettant leur dosage. En 1950, BURLET (5) a pu démontrer l'existence, dans des extraits végétaux, d'un « *facteur de croissance* » ou d'une « *stimuline* » ne répondant pas aux propriétés physico-chimiques et à l'activité microbiologique des *facteurs de croissance et des vitamines* actuellement connus. Avec MEYER, il a eu recours à de nombreuses bactéries susceptibles de servir de test, en se référant aux méthodes microbiologiques de *dosage des vitamines* (*Assoc. Vitamin Chemists* (6) WELSCH (7) et sachant que l'on emploie pour ces méthodes soit des *organismes levuriens*, soit, de préférence, *des bactéries du groupe des ferments lactiques*, exigeant intégralement le facteur de croissance à doser qu'ils sont incapables de synthétiser par leurs moyens autotrophes (organismes du type physiologique d'allométatrophique). Il s'agit de bactéries essentiellement glucidolytiques, se rapprochant des ferments levuriens. Parmi ces germes, on peut différencier plusieurs groupes :

1° *Bactéries de la fermentation lactique vraie* (bâtonnets Gram-positifs, ne produisant ni catalase, ni réductase).

2° *Bactéries de la fermentation lactique accessoire* (bâtonnets Gram-négatifs, producteurs de catalase et de réductase).

3° *Bactéries de la fermentation propionique* (bâtonnets Gram-positifs, dépourvus de catalase et de réductase).

4° *Bactéries des fermentations butyrique et acétonobutyrique* (bâtonnets anaérobies, Gram-positifs, dépourvus de catalase, mais producteurs de réductase).

Une seconde raison a incité ces auteurs à mettre à l'épreuve des *organismes glucidolytiques :* il fallait trouver une technique permettant facilement l'évaluation quantitative de la réponse des microorganismes à des doses variables du facteur de croissance étudié, *les Biostimulines.* La production de gaz et particulièrement de l'anhydride carbonique, par ces organismes devait permettre de doser ces Biostimulines par évaluation volumétrique de ce gaz mis en liberté en rapport direct avec les doses progressivement augmentées du facteur de croissance. C'est pour ces raisons que leur choix s'est finalement arrêté sur un microorganisme particulier : *Zymomonas mobile Lindner.* Cette bactérie a été isolée au Mexique du jus d'Agave par LINDNER, désignée initialement par le nom de *Termobacterium mobile* ou *Bacterium termo d'Ehrenberg* et rangée dans le groupe des bactéries employées dans l'industrie de la bière. Elle a été considérée par EHRENBERG comme faisant partie des plus petites bactéries d'où le nom de « *termo* = fin = limite inférieure finale ». Il ne faudrait pas confondre ce nom avec « *thermobactérie* = bactérie poussant à des températiures supérieures à 38° ».

KLUYVER et HOPPENBROUWERS (8) ont ensuite classé ce germe parmi les *Pseudomonas* de LEHMANN et NEUMANN (9). Étant donné la mobilité de toutes ces bactéries, le nom de *Pseudomonas mobile* devenait cependant caduc; vu d'autre part les propriétés biochimiques sur lesquelles nous aurons l'occasion de revenir : la désassimilation typiquement oxydative des *Pseudomonas*, la production d'une zymase très active et la fermentation particulière du glucose, la création du genre *Zymomonas* se trouvait entièrement justifiée.

C'est à l'aide de cette bactérie-test que BURLET, puis FAUDI, ont étudié *un facteur de croissance* dans un extrait aqueux préparé avec des *germes de maïs* et ont pu démontrer qu'il s'agit d'une *Biostimuline* qui se retrouve seulement dans l'extrait aqueux préparé selon la technique de BURLET au moyen de germes de maïs non épuisés par une extraction aqueuse trop poussée ni par l'anhydride sulfureux et portant encore la pellicule de la graine.

Nous nous sommes servi d'une préparation répondant à ces exigences comme test de référence, pour déterminer le titre *en Biostimulines de différentes préparations pharmaceutiques* actuellement employées en clinique pour le traitement de plaies atones et d'autres lésions nécessitant une stimulation de la division et de la croissance cellulaire.

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, nous ne voudrions pas manquer de remercier bien vivement Monsieur R. SARTORY, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg;* il nous a accueilli avec affabilité dans son laboratoire, a suivi nos travaux avec le plus grand intérêt et nous fait l'honneur de présider aujourd'hui notre jury de thèse.

Nos remerciements vont également à Monsieur Ch. LAPP, *Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour la gentillesse avec laquelle il a accepté de siéger dans ce jury.

Toute notre reconnaissance est acquise à Monsieur J. MEYER, *Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg;* après nous avoir suggéré le sujet de notre travail, il nous a guidé de ses conseils, nous aidant ainsi à le mener à bien.

Nous n'oublions pas non plus avec quelle amabilité Monsieur J. MALGRAS, *Chargé de Cours à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, nous a reçu et fourni les renseignements dont nous avions besoin au cours de notre travail. A tous ceux que nous avons connus dans le si sympathique Service de Bactériologie, nous assurons ici notre durable et amical souvenir.

PLAN DE TRAVAIL

Le but de notre travail est de perfectionner *les méthodes de dosage de l'activité de facteurs biogènes*, selon la définition de FILATOV, devant permettre de contrôler *les extraits placentaires et autres médicaments biogènes*.

C'est pour cette raison que nous donnons dans *la première partie de notre travail l'historique de la thérapie* par les extraits placentaires, en insistant plus particulièrement sur leurs propriétés biologiques et leur définition.

Dans le second chapitre nous donnons les méthodes microbiologiques de *dosage des Biostimulines*. A ce sujet, nous avons recours à une bactérie-test : *Zymomonas mobile Lindner* que nous étudions au point de vue de ses caractères morphologiques, culturaux et biochimiques. Dans ce même chapitre, nous décrivons les différents appareils nécessaires pour mener à bien nos recherches.

Nos travaux personnels font l'objet de *la deuxième partie* de notre exposé. *Un chapitre* est spécialement réservé à nos expériences préliminaires concernant *le dosage des Biostimulines* par la méthode gazométrique et la méthode biophotométrique.

Le Chapitre IV constitute la partie essentielle de notre travail. Après avoir mis au point nos techniques de dosage, nous contrôlons l'activité biogène de 14 *extraits placentaires d'origine suisse, allemande et italienne*. Nous illustrons nos résultats par des graphiques; ceux obtenus par la méthode semi-quantitative *en boîtes de Pétri* sont illustrés par des photographies en couleur.

Des Conclusions générales terminent notre exposé.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

HISTORIQUE DE LA THÉRAPIE PAR LES EXTRAITS PLACENTAIRES

Dans son travail précurseur sur les *Biostimulines d'origine végétale* Faudi a classé les facteurs de croissance dans deux grands groupes : *les biocatalyseurs à action générale et les biocatalyseurs à action sélective.* Dans le premier groupe, il range en particulier *les différentes Vitamines et des Coenzymes plus ou moins en rapport avec celles-ci;* dans le deuxième groupe, il cite une *hormone de régénération tissulaire*, activant la multiplication et la division cellulaire au niveau des plaies et des traumatismes, puis *l'Histidine*, activateur de la circulation plasmatique, *les substances issues des glandes à sécrétion interne et les hormones gonadotropes.*

Comme *catalyseur végétal*, il faut mentionner *l'auxine* α *et* β ainsi que *l'hétérauxine* qui sont des agents de la régulation de la croissance des plantes. D'autre part, on trouve dans ce groupe *l'Acide folique, la Vitamine* B_{12}, *la Streptogénine* et quelques autres facteurs d'origine animale ou végétale, ces derniers surtout produits par des *Moisissures.*

Finalement, Faudi range encore dans ce deuxième groupe les *Biostimulines* découvertes par Filatov en 1933. Cet auteur a constaté qu'un greffon de cornée conservé en glacière pendant plusieurs jours, non seulement prenait aussi bien qu'un greffon fraîchement prélevé, mais encore déterminait autour de lui un éclaircissement de la cornée malade et parfois même, dans les cas les plus favorables, provoquait l'éclaircissement de la cornée de l'autre œil malade non traité par une greffe.

En se basant sur cette découverte, Gate et Vacher (30) ont établi les données suivantes :

1° Dans un tissu vivant, placé dans des conditions *de milieu défavorables*, on voit apparaître au cours de sa lutte pour la vie des substances de résistance, *les stimulines biogènes*, qui ne semblent pas spécifiques des tissus en souffrance.

2° Les *stimulines biogènes* introduites dans un organisme quelconque par tel ou tel procédé (implantation, injection d'extraits, etc.) activent les processus vitaux de cet organisme, augmentent ses capacités de réaction aux agents agressifs de toute nature et stimulent ses possibilités de guérison.

L'universalité d'origine et d'action sont les deux principes fondamentaux de la thérapie tissulaire.

On voit ainsi que les bases de la thérapie de Filatov résident dans le fait que des *tissus vivants animaux ou végétaux exposés à des conditions défavorables, mais non mortelles pour eux, élaborent des substances biologiquement hautement actives.* Ces facteurs biogènes devraient stimuler les moyens de défense de l'organisme malade et ainsi contribuer à la guérison. Les conditions de milieu favorables à la production de *Biostimulines* sont variables : on cite ainsi pour les tissus animaux l'exposition au froid (+ 3° à + 4°) et pour les tissus végétaux, l'obscurité ou des rayonnements UV, X, etc. *Ce sont donc des phénomènes de « stress » qui déclenchent la production des Biostimulines.*

En partant de ces premières expériences sur les maladies oculaires, Filatov les a ensuite étendues à la médecine générale. Il avait obtenu des résultats très favorables particulièrement dans *la rétinite pigmentaire*, affection inguérissable jusqu'alors. A la suite de ce succès, un grand nombre d'auteurs ont eu recours à cette thérapie tissulaire en *ophtalmologie* à partir de 1946 et 1947. Les méthodes employées étaient l'implantation sub-conjonctivale de tissu placentaire ou l'injection sub-conjonctivale, sous-cutanée ou intramusculaire d'extraits placentaires aqueux.

Depuis lors, bien des travaux ont été publiés, dont les conclusions sont assez discordantes : à côté de succès éclatants, on rapporte des échecs complets. D'autre part, *la théorie de* Filatov semble encore douteuse surtout parce qu'on n'a pas pu, jusqu'à présent, caractériser la constitution chimique de *ces Biostimulines*. De nombreux auteurs ont obtenu des résultats cliniques aussi bons et même meilleurs par l'implantation de tissus frais. Dans ces cas, *les Biostimulines* ne peuvent pas jouer un rôle, puisque leur formation s'effectue uniquement par exposition des tissus à des conditions défavorables : l'on pourrait penser à une *action vasodilatatrice ou hormonale*, car Boros (11) a pu déceler une action pseudo-histaminique de l'extrait placentaire de Filatov sur l'intestin de cobaye. D'autre part, Moginier (12) *effectuant des expériences comparatives avec des implants placentaires et de l'Acide nicotinique*, a émis l'opinion que les deux traitements donnaient des résultats comparables grâce à leur propriété vasodilatatrice. Bischoff (14) recommande la thérapie tissulaire de Filatov dans les maladies réfractaires aux autres traitements.

Propriétés biologiques des extraits placentaires de FILATOV:

Comme nous l'avons déjà mentionné, *la constitution chimique des Biostimulines* est encore inconnue. On a voulu rendre responsables des

polypeptides, des *acides gras en général* ou les *acides gras essentiels*, des *combinaisons à liaison sulfhydryle*, des *acides nucléiques indéterminés*, etc. Il est probable qu'il ne s'agit ni de protéines, ni d'enzymes proprement dites. D'après Filatov, *ces stimulines doivent apparaître au cours du métabolisme biochimique des protéines plasmatiques*. Il faut remarquer que des *Biostimulines* ont été isolées à partir de racines et de feuilles d'Aloès placées dans les conditions adéquates. Ayant pu constater une augmentation de l'acidité des préparations d'Aloès conservées à l'obscurité, Filatov croit que *les Biostimulines* pourraient être des acides, en particulier des acides dicarboniques ou des complexes de ces acides.

En ce qui concerne le mode d'action de *ces Biostimulines*, Filatov a fait l'expérience suivante : il mélange les extraits de feuilles d'Aloès préalablement chauffés à 120° avec des ferments dont le pouvoir protéolytique est détruit et constate que leurs propriétés enzymatiques réapparaissent, et si l'on met l'extrait végétal en présence de ferment protéolytique actif, cette activité est augmentée. Filatov *croit pouvoir en conclure que les Biostimulines agissent en activant les propriétés enzymatiques de l'organisme et en régénérant des enzymes déficientes*.

Les résultats thérapeutiques et expérimentaux éclairent d'un jour nouveau certains problèmes de pathologie, de biologie et de thérapeutique et ceci malgré certains insuccès. On a ainsi eu recours à la thérapie *des Biostimulines* dans certaines maladies dermatologiques, dans l'ophtalmolgie, dans la tuberculose, dans des ulcères gastriques, etc.

Boros a essayé en 1951 de déterminer *les propriétés biologiques* des extraits préparés selon la technique de Filatov : il voulait savoir en particulier si les produits notoirement actifs des extraits placentaires, tels que *l'Histamine*, *l'Acétylcholine*, etc., subsistaient après exposition d'une heure à l'autoclave à 120°. On pouvait en effet se demander si ces extraits ne contenaient pas des vasodilatateurs qui occasionnent une meilleure diffusion dans le tissu pathologique, responsable de la guérison ou qui exercent une action stimulatrice sur les médicaments. Cette question peut se justifier, puisque l'extrait placentaire préparé d'après les prescriptions de Filatov constitue une solution hypotonique à réaction acide qui peut déclencher dans les tissus, *soit directement soit par axone-réflexe*, la libération d'Histamine. D'autre part, il faut noter que par suite de *l'autolyse post-mortem* des tissus implantés une grande quantité d'*Acétylcholine* peut être libérée et que, de plus, les bactéries peuvent dégrader des protéines formant ainsi des Amino-acides et en particulier de *l'Histamine*. Les germes infectieux n'ont pas de prise sur *l'Acétylcholine* qui est rapidement dégradée par les acides et subit ainsi après très peu de temps une hydrolyse, accélérée encore par sa thermolabilité.

Il faut par contre attribuer un rôle important à l'Histamine, puisqu'elle est très thermostable et se trouve en quantité appréciable encore après plusieurs heures d'ébullition en milieu acide.

Boros a encore admis que les extraits de Filatov contiennent un excès *d'ions de Calcium*, et c'est pour cette raison qu'il a comparé

l'activité thérapeutique des extraits avec celle des ions de Calcium. Le dosage a montré que 100 cc d'extrait placentaire contiennent en moyenne 2,2 mg de Calcium et 2,6 mg de Potassium. Cependant, les cendres de 100 cc d'extrait reprises dans 100 cc de *solution de Ringer* et employées à la dose thérapeutiquement active des extraits naturels, n'avaient aucune action. Bien que le taux de Calcium joue un certain rôle dans l'activité des extraits placentaires, cette dernière n'est pas comparable à l'action du Calcium seul. *En principe, on peut déduire de ces données que les extraits placentaires de* Filatov *agissent par la libération « in situ » d'une certaine quantité d'Histamine.*

Étude biochimique des extraits placentaires:

Malgré la fréquence et l'emploi très varié de la thérapie par *les Biostimulines de* Filatov, on n'a jusqu'à présent aucune donnée précise sur son intervention biologique et sur sa constitution biochimique. On emploie *ces Biostimulines* sous forme d'extraits de muqueuse gastrique et hépatique, de muscle cardiaque et surtout de placenta, dans le traitement de régénération de tissus cutanés, d'ulcères, dans des disfonctions et des troubles métaboliques. *Les extraits placentaires* sont ceux qui ont été les plus expérimentés cliniquement, et ceci principalement par des implantations de tissus. Ce mode de thérapie est souvent employé sans examen préalable déterminant son indication, de sorte que l'on relate souvent des résultats négatifs pour des cas ne relevant pas de cette application.

Rauch, Zender et Koestlin (14) ont essayé d'étudier la *constitution chimique des extraits placentaires* et ils ont posé à ce sujet différentes questions :

— L'action des extraits placentaires pourrait être purement cellulaire, agissant sur le métabolisme de chaque cellule isolée.

— D'autre part, il pourrait s'agir d'un effet spécifique pour un organe donné ; ainsi, l'extrait placentaire pourrait agir sur les vaisseaux (vasodilatation), les nerfs, le tissu interstitiel, le système réticulo-endothélial ou lymphatique, etc., et stimuler ainsi indirectement le tissu cellulaire traumatisé.

Pour l'étude de ces problèmes, ils ont suivi trois directions :

1° *Contrôle de l'échange gazeux d'oxydoréduction* (O^2 — CO^2) en présence de différentes concentrations d'extraits placentaires (technique de Warburg).

2° *Contrôle histochimique* des modifications provoquées par les injections répétées d'extrait placentaire sur le taux d'Acide ribonucléique, d'Acide désoxyribonucléique et des différentes enzymes, telles qu'Estérases, Décarboxylases et Phosphatases acides, neutres et alcalins.

3° *Analyse élémentaire quantitative des extraits placentaires.* Les auteurs ont obtenu les résultats suivants :

TABLEAU N° 1

Élément :	exprimé en	Valeur trouvée	Valeur du sérum normal
Azote total	mg %	76	1 000
Protéines totales	mg %	480	7 000
Azote résiduel	mg %	37	30
Urée	mg %	12	25
Acide urique	mg %	0,24	3
Créatinine	mg %	0,04	1
Cholestérol total	mg %	42	200
Lipides totaux	mg %	590	600
Dérivés cétoniques	—	—	—
Glucose	mg %	22	90
Sodium	mEq/litre	129	140
Potassium	» »	3,3	4
Chlore	» »	120	110
Phosphore minéral	» »	4,8	3
Fer	γ %	40	110
Anhydride carbonique	mEq/litre	0,81	25
Calcium	» »	2,4	5
Abaissement du point de congellation		0,51°	0,56°
Phosphatase alcaline	U.	8,75	4
Phosphatase acide	U.	4,8	3

Les auteurs concluent que le taux d'électrolytes de tous leurs extraits placentaires se rapprochent sensiblement de celui du sérum normal. D'après SANZ-SCHWARTZ, *le diagramme électrophorétique* permet de différencier les protéines totales comme suit :

TABLEAU N° 2

Éléments	Valeur trouvée g %	exprimée en % des protéines totales
Protéines totales	6,37 — 7,77	100 %
Albumine	3,50 — 3,85	50 — 55
Globulines	3,15 — 3,50	45 — 50
α_1-globulines	0,28 — 0,60	4 — 8
α_2-globulines	0,56 — 0,80	8 — 12
β-globulines	0,77 — 1,00	11 — 14
γ-globulines	1,26 — 1,60	18 — 22

A titre comparatif nous donnons les valeurs indiquées par RAUCH et ZENDER pour un extrait placentaire :

TABLEAU N° 3

Éléments	Valeur exprimée en % des protéines totales
Protéines totales	100 %
Albumine	22,5
Globulines	77,5
α-globulines	9,5
β-globulines	55,5
γ-globulines	12,5

Comme on le voit, les valeurs indiquées par les deux groupes de chercheurs sont très discordantes.

Les extraits placentaires humains et animaux sont caractérisés par leur forte teneur en *Phosphatase;* ainsi DEMPSEY et WISLOCKI (15) ont pu mettre en évidence dans les extraits placentaires humains les *Fructoses-diphosphatases*, *Glycérophosphatases*, *Lécithinases et Ribonucléases.* Ces Phosphatases sont encore plus facilement décelables dans les placentas mêmes que dans les extraits, puisque ces enzymes sont assez thermolabiles (maximum 60° à 70°). Les *Phosphatases des extraits placentaires* proviennent presque exclusivement des parties fœtales du placenta. Nous ne savons cependant pas *si elles sont des facteurs intégraux des Biostimulines ou si elles se transforment en Biostimulines par des réactions métaboliques ou cataboliques.* Comme nous l'avons déjà dit, *le mécanisme chimique* de l'activité biostimulante n'est pas encore résolu jusqu'à présent. On sait que le placenta humain est très riche en substances biologiques hautement actives (enzymes, hormones, mucopolysaccharides, etc.), mais on n'a pas pu isoler une Biostimuline pure.

Définition d'un extrait placentaire:

Jusqu'à ces dernières années, il n'existait pas de méthode de dosage de l'activité des *Biostimulines placentaires.* On connaissait un certain nombre de techniques permettant de déterminer indirectement l'activité biogène des extraits placentaires, parmi lesquelles :

1° *Dosage du métabolisme des « tissus en cultures » par l'appareil de* WARBURG, en contrôlant les réactions d'oxydo-réduction par le dégagement d'oxygène et de gaz carbonique.

2° *Dosage de l'activité enzymatique :* par exemple des Phosphatases acides, neutres et alcalines, par la méthode de KING et ARMSTRONG; le dosage de la phosphatasémie s'effectue par l'hydrolyse enzymatique du

Monophénylphosphate disodique et par dosage colorimétrique de l'acide phénique mis en liberté. *L'unité King-Armstrong* correspond à la quantité de phosphatase libérant, dans 100 cc de sérum, 1 mg de phénol en 30 minutes à un pH de 0,9.

3° *Méthodes mesurant le pouvoir germinatif de certaines graines*, telles que le *Cresson* ou les spores de *Alternaria tenuis* d'après SCHWARZENBACH.

KÜHTS et WIRBATZ (16) prétendent que la thérapie tissulaire de FILATOV peut être considérée comme sûre, étant donné les faits suivants : de nombreux *tests biologiques* le prouvent; ainsi la guérison plus rapide de plaies provoquées, l'augmentation de la fermentation levurienne, la germination plus rapide de certaines graines, la stimulation de la croissance des plantes, l'augmentation des propriétés d'absorption des plantes, l'hyperactivité enzymatique *des cultures de tissu*, la respiration intense d'un tissu cellulaire isolé, l'amélioration de la vision des yeux normaux.

Cependant les opinions sur le processus biologique consécutif à la thérapie tissulaire sont partagées et on en est encore réduit aux hypothèses. Il en est de même pour la conception de FILATOV même, concernant *la formation des Biostimulines* à la suite de la conservation des tissus dans des conditions défavorables. C'est pour ces raisons que beaucoup d'auteurs s'étonnent qu'on n'ait pas encore élaboré une méthode de *dosage des Biostimulines*, malgré leur emploi fréquent *en clinique*.

ZUMACH (17) a pu observer une altération de plantes traitées par des arrosages au moyen d'extraits tissulaires hautement concentrés et conservés au froid. FREYTAG (18) *a mis en évidence sur des cosses de haricot une multiplication cellulaire proportionnelle aux doses d'extrait tissulaire dilué avec lesquelles on les arrose*. En employant dans les mêmes conditions des extraits concentrés, il note un freinage de la division cellulaire.

FILATOV a déjà essayé d'élaborer *une méthode de dosage;* il propose de standardiser des extraits cutanés, de façon à ce que le résidu sec soit de 1,2 % et l'azote résiduel de 50 %. On se rend facilement compte que cette technique ne permet pas de contrôler l'activité biologique du produit. KÜHTS et WIRBATZ ont élaboré une réaction sur l'accélération de croissance des germes de plantes supérieures, alors que *la technique* de BURLET et FAUDI est basée sur la multiplication accélérée de certaines bactéries.

KÜHTS et WIRBATZ ont préparé leur extrait placentaire de la façon suivante : les placentas sont disposés dans de la glace concassée, immédiatement après la naissance et en tout cas dans les premières 15 minutes; on les conserve ainsi pendant 6 heures environ, on retire la membrane chorio-allantoïde et on dispose les placentas à la glacière dans de grandes boîtes de Pétri (2° à 6°). La préparation de l'extrait pour les premiers dosages doit avoir lieu environ 12 heures au plus tard après l'expulsion; pour ce faire, on prélève à différents endroits du placenta une dizaine de

fragments de la taille d'un haricot, qu'on introduit dans un ballon de 100 cc pour les laver à plusieurs reprises avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage ne soit plus que légèrement rosée. Après l'hypostase, les prélèvements ne doivent être effectués que dans les régions peu vascularisées. Le tissu ainsi lavé, on en prélève 10 g que l'on dilacère à l'aide de ciseaux, puis par trituration au mortier. Le broyat ainsi obtenu est repris dans 10 cc d'eau distillée et constitue la suspension même qu'on laisse reposer pendant une heure à 15°; on la chauffe ensuite pendant 30 minutes au bain-marie entre 60° et 80° et on stérilise pendant une heure à 120°. On obtient un liquide trouble, brunâtre, que l'on filtre à deux reprises pour éliminer les fragments tissulaires. L'état colloïdal, contrôlé par *le phénomène de Tyndall*, reste inchangé et le filtrat ainsi obtenu est désigné par le terme de « *solution-mère 1/1* ». Comme test, les auteurs ont employé des graines de Cresson (*Lepidium sativum*) et contrôlé la germination à l'étuve entre 26° et 27°. Pour ce faire, on dispose 100 graines dans des boîtes de Pétri de 8 cm de diamètre sur une couche de sable de quartz pesant 16 g et préalablement imbibée de 5 cc des différentes dilutions préparées à partir de la *solution-mère 1/1*. On considère comme germées les graines dont la cuticule extérieure est au moins fendue. Les auteurs ont pu constater que l'emploi de soluté physiologique à la place de l'extrait placentaire freine la germination.

A la suite de ces expériences, ils ont pu établir l'« *unité Filatov* » en rapport avec les dilutions actives de la solution-mère : 81 unités Filatov correspondent à une accélération de 10 % de la germination de graines de *Lepidium sativum*, par rapport à une autre série arrosée d'eau. Ils ont constaté cette activation au moyen d'un placenta conservé dans la glace concassée pendant 7 jours, lavé et remis en suspension dans l'eau distillée à la concentration de 1/81.

Cette méthode de dosage qui se justifie scientifiquement, est inapte au contrôle courant de préparations pharmaceutiques, c'est pourquoi nous avons cherché, en nous basant sur les travaux préalables de Faudi, à mettre au point une technique permettant de doser l'activité biostimulante de ces produits d'origine placentaire ou d'autre provenance.

CHAPITRE II

MÉTHODES MICROBIOLOGIQUES DE DOSAGE DES BIOSTIMULINES

Meyer, Burlet et Faudi avaient essayé de doser l'activité biogène de divers extraits de plantes supérieures (Maïs, Tomate, etc.), au moyen de tigelles de graines de *Maïs*, de *Pisum sativum* et de *Lepidium sativum*. D'autre part, ils ont contrôlé différents microorganismes sur leur capacité de servir de *réactif-test* dans ces expériences : *Staphylococcus aureus*, *Proteus* X-19, *Escherichia coli et Zymomonas mobile Lindner*. Ils ont ainsi pu constater que ce dernier germe se prêtait le mieux à ces dosages.

Description du Zymomonas mobile Lindner:

Zymomonas mobile a été isolé en 1925 à partir de jus d'agave par Lindner (19) qui l'a désigné par le nom de *Termobacterium mobile. En Hollande*, ce germe est utilisé dans l'industrie brassicole. Il a besoin pour son développement de glucose et de lévulose, il ne dégrade ni mannose, ni galactose, maltose, lactose, raffinose, arabinose, mannitol, dextrine. Cependant, il a besoin *d'un biostimulateur* qui se trouve en grande quantité dans le moût de bière.

Zymomonas mobile est une bactérie très fragile, sa vitalité est assez restreinte, il se maintient en culture pendant trois semaines environ et si le glucose ou les autres oses assimilables sont épuisées, il succombe encore plus rapidement. *Une des propriétés les plus caractéristiques de Zymomonas mobile est d'utiliser complètement les sucres assimilables, en libérant une très grande quantité de gaz carbonique.* Le processus chimique dû à ce phénomène modifie grandement le pH du milieu.

Gibbs et Demoss (20) ainsi que H. Nicol (21) ont fait des études à ce sujet; on sait en effet que la formation d'éthanol s'effectue pendant la fermentation hétérolactique du glucose par *Leuconostoc mesenteroïdes*, par des stades différents du processus de *glucolyse d'Embden-Meyerhof-Parnas*. L'éthanol de la fermentation du *type levure* (E.M.P.) est dérivé des atomes de carbone 1, 2, 5, 6 du glucose, le groupe méthyle représentant les carbones 1 et 6, alors que dans la fermentation hétérolactique seuls les carbones 2 et 3 donnent l'éthanol, le méthyle représentant le carbone neutre.

Il était donc intéressant de savoir si d'autres fermentations bactériennes étaient du *type* E.M.P. ou d'un autre. Les auteurs ont choisi *Zymomonas mobile Lindner* comme bactérie-test à cause de son grand rendement en éthanol. Leur travail a montré que le processus de formation d'éthanol diffère de celui du *type* E.M.P. et également de celui *d'hexose-monophosphate* des bactéries hétérolactiques. Le mécanisme enzymatique se rapproche de celui de *Pseudomonas saccharophila* étudié par Entner et Doudoroff (20).

Gibbs et Demoss ont effectué leurs recherches en employant comme isotope le ^{14}C et ont constaté que *Zymomonas mobile Lindner* dégrade le glucose en fermentation anaérobie, en produisant à partir d'une molécule de glucose 1,8 mol. de CO^2, 1,9 mol. d'éthanol et une trace d'acide lactique. La répartition du ^{14}C dans les produits de la fermentation a été recherchée au moyen de glucose 1—^{14}C, 2—^{14}C, 3,4—^{14}C, 6—^{14}C et de lévulose 1,6—^{14}C. Les auteurs ont ainsi pu constater :

1° Le CO^2 provient du carbone 1 et 4 du glucose.

2° Les carbones 2, 3, 5, 6 du glucose passent dans l'éthanol. Les carbones 2 et 5 forment les *carbonates.*

3° Le lévulose et le glucose sont fermentés d'après le même schéma, car le lévulose 1,6—^{14}C donne du $^{14}CO^2$ et de l'éthanol marqué en méthyle qui sont semblables à ceux trouvés avec le glucose 1—^{14}C et le glucose 6—^{14}C.

4° La transformation du glucose en CO^2 et éthanol par le *Zymomonas mobile Lindner* passe par un processus différent, au moins en partie, de celui connu pour le *type* E.M.P. et de celui du *type d'héxose-monophosphate par Leuconostoc mesentéroïdes.* Les atomes marqués semblent indiquer qu'ils suivent un processus de dégradation semblable à celui de l'hydrolyse du glucose par *Pseudomonas saccharophila.*

Ces travaux montrent donc les caractéristiques différentielles très nettes du pouvoir enzymatique de *Zymomonas mobile Lindner* et permettent d'expliquer la forte production d'alcool de cet organisme à partir des hexoses.

Ce germe est très thermosensible et ne résiste pas à des températures dépassant 30°. L'optimum cultural se trouve entre 18° et 27° ; les températures trop basses arrêtent le développement. Lors de nos essais, nous avons cultivé *Zymomonas mobile* sur un milieu au moût de bière non houblonné, à 4 % de glucose. Il s'agit donc d'un substrat liquide et le repiquage est effectué tous les 15 jours.

Cette bactérie n'évolue guère sur les milieux peptonés ou protidiques ; son développement est possible en milieu liquide ou solide à base de peptone, d'extrait de levure ou de moût de bière additionné de 2 à 10 % de glucose et initialement ajusté à pH = 6,5. Un pH plus alcalin empêche sa croissance.

Au point de vue morphologie, Zymomonas mobile Lindner est un Diplobacille mobile, le plus souvent étranglé vers sa partie médiane. Il mesure 4 à 5 μ sur 1,4 à 2 μ; il s'agit d'une bactérie Gram-négative,

asporulée, munie d'une touffe de cils polaires, comme le montrent nos microphotographies (pages 20 et 21).

Méthode de coloration des cils:

Pour mettre en évidence ces cils, et étudier leur disposition, nous avons eu recours à la méthode de ZETTNOW (21), modifiée par ROMOND et ses collaborateurs (22). On prépare les réactifs suivants :

Solution de mordant:

On dissout 2 g d'Antimonio-tartrate acide de potassium (*Tartarus stibiatus*) dans 40 cc d'eau et 10 g de Tannin dans 200 cc d'eau. Cette solution est chauffée entre 50° et 60°; on y ajoute 25 à 30 cc de la première solution puis on chauffe jusqu'à ce que le précépité qui s'est formé ait disparu et que l'on obtienne un liquide limpide. On prélève ensuite un petit échantillon de ce réactif, que l'on introduit dans un tube à essai et on le plonge dans l'eau froide; l'échantillon doit rester trouble 5 à 10 minutes après refroidissement, mais le trouble ne doit pas être trop intense. Si le réactif reste limpide, il faut y introduire encore environ 1 cc de la solution d'Antimoine; si par contre, il prend un aspect laiteux, il faut y introduire une trace de poudre de Tannin. Le réactif mordant ainsi préparé doit rester absolument limpide au chauffage à 75° — 80° et ne pas donner de précipité après refroidissement.

Solution d'Éthylamine argenté:

On prépare une solution aqueuse saturée de Sulfate d'argent en dissolvant à froid par agitation 2 à 3 g de Sulfate d'argent dans 200 cc d'eau distillée. On introduit 5 cc de cette solution dans un tube à essai, on dilue avec 5 cc d'eau distillée et l'on ajoute goutte à goutte une solution d'Éthylamine à 33 % jusqu'à ce que le précipité qui se forme au début se redissolve complètement.

Technique proprement dite:

Il importe d'employer des lames rigoureusement propres pour réussir la coloration des cils, c'est pourquoi on emploie des lames neuves n'ayant jamais servi. On les place pendant 2 à 3 jours dans une solution de Permanganate de potasse à 5 %, on les rince à l'eau distillée puis avec un mélange de solution d'Acide sulfurique et d'Acide oxalique à 1 % chacune. A la rigueur en peut les laisser pendant quelques heures dans ce mélange. On les rince encore à l'eau distillée, dans laquelle on les laisse baigner. Au moment de l'emploi, on les sèche sur papier-filtre à l'abri de la poussière.

La bactérie est cultivée sur le moût de bière gélosé glucosé à 4 % pendant 20 à 25 heures. On prépare un tube à hémolyse contenant 1 % d'eau distillée stérile et on dépose en surface, sur le bord de ce tube, une

öse de culture. Celle-ci doit se mélanger spontanément avec l'eau distillée. Pour réaliser une répartition homogène, on dispose les tubes à hémolyse préalablement à 27° et après l'introduction des bactéries, on porte les tubes à 27° pendant 30 à 60 minutes.

Nous avons effectué un certain nombre d'expériences, les unes avec le fixateur d'Acide osmique, les autres sans ce réactif et nous nous sommes rendu compte que son emploi est superflu.

On prépare d'autre part une pipette de Pasteur effilée et recourbée en angle droit à son extrémité capillaire ; celle-ci doit être franchement coupée et égalisée à la flamme. On prélève avec cette pipette un peu de suspension bactérienne à la surface du tube à hémolyse et on dépose de fines gouttelettes sur une lame parfaitement propre en appuyant la pipette sur la lame (ne pas laisser tomber la goutte). On sèche ensuite à l'étuve et on passe le frottis à deux reprises à travers la flamme du bec Bunsen pour la fixation, puis on dispose dans *la solution de mordant préalablement chauffée*, la face chargée de la lame tournée vers le bas. Laisser agir pendant 5 à 7 minutes à une température de 90° à 100°. On retire ensuite la flamme et on laisse refroidir jusqu'à ce que le réactif commence à se troubler sans dépasser ce stade. On retire la lame, on la rince soigneusement avec l'eau distillée en la plaçant horizontalement; on la couvre d'une couche épaisse de *solution d'Éthylamine argenté* après avoir éliminé l'eau et on chauffe jusqu'à émission de vapeur. Le chauffage doit être poursuivi jusqu'à ce que le bord du frottis ne soit plus seulement coloré en jaune, mais en noir (5 à 10 minutes). Ne pas laisser l'Éthylamine se concentrer trop, en rajouter si c'est nécessaire. Laver soigneusement à l'eau avec les précautions nécessaires pour éviter la fêlure de la lame, en gardant le frottis toujours en position horizontale. Laisser sécher à l'air et examiner à l'immersion; si la coloration est bien faite, les bactéries et les cils doivent apparaître en noir sur fond parfaitement transparent.

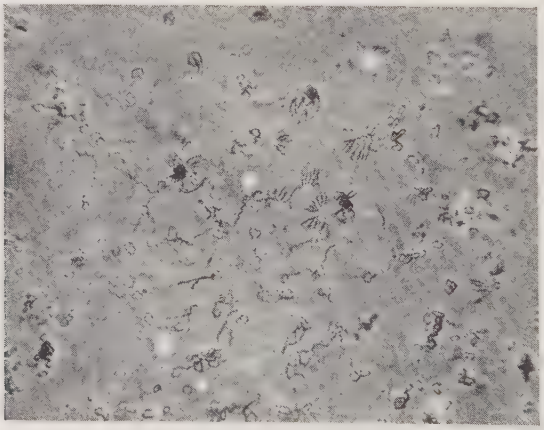


Fig. N° 1
Zymomonas mobile: Bactéries ciliées.

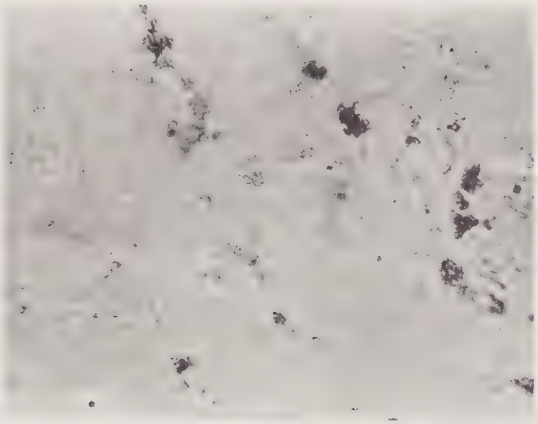


Fig. N° 2

Bactéries peu ciliées. Remarquer au centre deux bactéries avec leur touffe de cils polaires; dans les zones périphériques, bactéries ayant perdu leurs cils.

Autres propriétés biochimiques de Zymomonas mobile Lindner:

En dehors des glucides, notre bactérie a des exigences particulières, comme nous l'avons déjà vu, vis-à-vis des substances protéiques. Elle se développe dans le lait avec production d'une très légère acidité, mais sans coagulation. Elle ne liquéfie ni le sérum coagulé, ni la gélatine, ni le blanc d'œuf coagulé. Elle ne produit pas d'indole, mais réduit les nitrates et le rouge neutre; elle ne produit pas d'anhydride sulfureux.

En résumé, *Zymomonas mobile* est un organisme assez exigeant, nécessitant la présence de glucose ou de lévulose dans le substrat nutritif et des produits protéidiques, animaux ou végétaux, plus ou moins dégradés.

Burlet et Faudi ont effectué un certain nombre d'expériences pour sélectionner des milieux de choix : ils ont ainsi employé des *extraits de figues*, *l'autolysat de levure*, *le Protéolysat Ronchèse* et d'autres substrats plutôt synthétiques.

En nous référant à ces auteurs, nous avons préparé les milieux suivants :

Bacto Pantothenate Assay Medium Difco:

Il s'agit d'un milieu déshydraté, destiné au dosage de *l'Acide panthénique*; il est donc dépourvu *d'Acide pantothénique ou de Pantothénate*, mais contient tous les autres principes nutritifs nécessaires au développement de *Lactobacillus arabinosus* 17-5 *ATCC* 8014. L'addition *de Pantothénate* au taux strictement nécessaire pour le développement du

Lactobacillus arabinosus 17-5 permet une croissance régulière de ce germe s'inscrivant sur une droite, en rapport avec le temps de culture; la croissance peut ainsi être mesurée acidimétriquement ou turbidimétriquement. *Le Bacto Pantothenate Assay Medium* est une modification du milieu mis au point par Skeggs et Wright (23). Sa composition est la suivante :

Bacto Vitamin-free casamino-acids	12,00	g
Bacto dextrose	40,00	g
Natrium acetat	20,00	g
l-Cystine Difco	0,20	g
dl-Tryptophan	0,20	g
Adenin sulfat	0,02	g
Guanin HCl	0,02	g
Uracil	0,02	g
Thiamine HCl	0,002	g
Riboflavin	0,002	g
Niacin	0,002	g
Pyridoxin HCl	0,004	g
p-Aminobenzoïc acid Difco	0,002	g
Biotin	0,0000008	g
Dikaliumphosphat	1,00	g
Monokaliumphosphat	1,00	g
Magnesiumphosphat	0,40	g
Natrium chlorid	0,02	g
Sulfate ferreux	0,02	g
Sulfate de manganèse	0,02	g

Préparation du milieu de culture:

Nous avons complété le *Bacto Pantothenate Assay Medium* pour constituer un milieu adapté aux besoins de notre *Zymomonas :*

Bacto Pantothenate Assay Medium Difco	40,0	g
Pantothénate de calcium	200,0	γ
Chlorure de calcium	2,0	g
Glucose	20,0	g
Eau distillée q.s.p.	1000,0	cc

Dans ce milieu, contenant la totalité des vitamines et facteurs de croissance nécessaires à la vitalité des bactéries, *Zymomonas mobile* se développe lentement; il s'agit d'un milieu d'entretien, le Chlorure de calcium sert de tampon neutralisant le substrat au fur et à mesure de la formation d'Acides et surtout d'Anhydride carbonique par le méta-

bolisme glucidique du Zymomonas. En nous basant sur les travaux de Faudi, nous avons préparé le milieu suivant pour le dosage des Biostimulines.

Milieu au moût de bière:

Moût de bière non houblonné	1000,0 cc
Glucose	40,0 g

On tyndallise à 100° pendant une heure et deux jours consécutifs, on répartit le milieu ajusté au pH voulu dans des tubes stériles et on tyndallise encore une heure par chauffage à 100°. Nous avons ainsi obtenu un milieu de bonne conservation et qui se prêtait à nos expériences.

Pour obtenir un milieu solide, nous y avons incorporé 2 % de gélose. Nous avons eu recours au *Bacto Agar Difco*, puisque cette gélose se dissout plus rapidement et ne nécessite plus de filtration.

Pour évaluer quantitativement *la croissance de notre Zymomonas mobile en rapport avec le taux de Biostimulines*, nous avons eu recours à la biophotométrie à l'aide de *l'appareil Bonet-Maury de Jouan.*

Description de l'appareil Bonet-Maury:

Cet appareil travaille tout à fait automatiquement et se compose des pièces suivantes :

— *Un photomètre* placé dans une enceinte thermostatique contrôlée par un régulateur de température bimétallique à cadran et un voyant lumineux règlant la température ambiante jusqu'à 45°. La précision du réglage est de l'ordre de ± 0,2°.

Le faisceau lumineux correspondant à chaque cuve peut être diaphragmé. Chaque diaphragme est indépendant et commandé par un disque moletté. Pour travailler dans des intervalles de longueur d'ondes donnés, des filtres peuvent être interposés devant la cuve dans des emplacements spécialement prévus. En cas de solution peu colorée, des filtres neutres peuvent être interposés entre cuve et cellule pour diminuer l'intensité du flux lumineux. Toute une gamme de cuves d'épaisseurs différentes est prévue, depuis la cuve standard de 30 mm, pour milieu peu absorbant jusqu'à la cuve de 5 mm pour milieu allant jusqu'à une densité optique élevée de l'ordre de 1,5 à 2,0.

— *Six cuves se déplaçant automatiquement toutes les* 20 *secondes.* Chaque cuve est constituée par un cylindre de verre Pyrex horizontal, limité par deux faces optiquement planes, parallèles et soudées. Leur capacité utile reste constante, elle est d'environ 10 cc pour les cuves standard. La surface du liquide peut rester en contact avec l'air par l'intermédiaire de la tubulure verticale de remplissage ou vidange.

A l'intérieur de chaque cuve se trouve soit un barreau métallique enrobé de verre Pyrex, soit une bille métallique spécialement protégée, animée magnétiquement d'un mouvement de va-et-vient à vitesse et intensité réglable.

— *Un enregistreur :* le galvanomètre enregistre automatiquement et successivement toutes les 20 secondes six courbes par six faisceaux émis par la même lampe. La courbe correspondant à chaque faisceau traduit le pourcentage de transmission, la variation d'opacité du liquide à mesurer placé dans la cuve correspondante. Le galvanomètre à six courbes est encastré dans le panneau de commande de la boîte d'alimentation. La vitesse de déroulement du papier enregistreur est constante et peut être réglée aisément à deux vitesse différentes, de 20 et 60 mm par heure.

— *Une alimentation électrique :* l'alimentation stabilisée sur un secteur alternatif de 50 périodes compense les variations de tension de fréquence et amène ainsi la stabilité absolue dans le temps. La boîte d'alimentation est reliée à l'enceinte thermostatée par un câble multiple, souple, sous gaine de protection plastique.

Nous donnons ci-joint deux photographies illustrant les deux pièces essentielles de l'appareil :

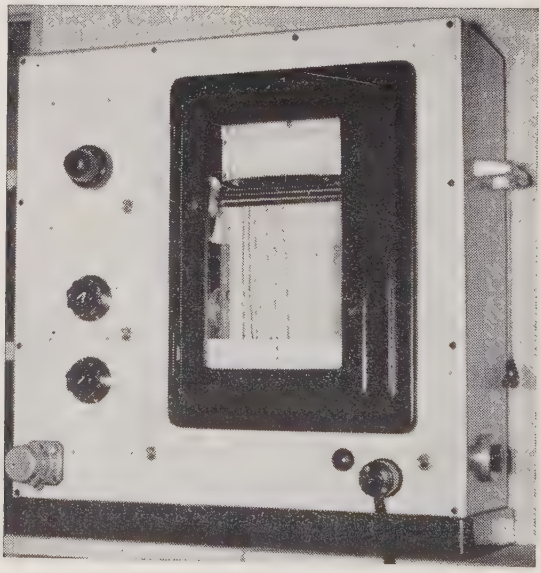


Fig. N° 3

Appareil enregistreur de Bonet-Maury.

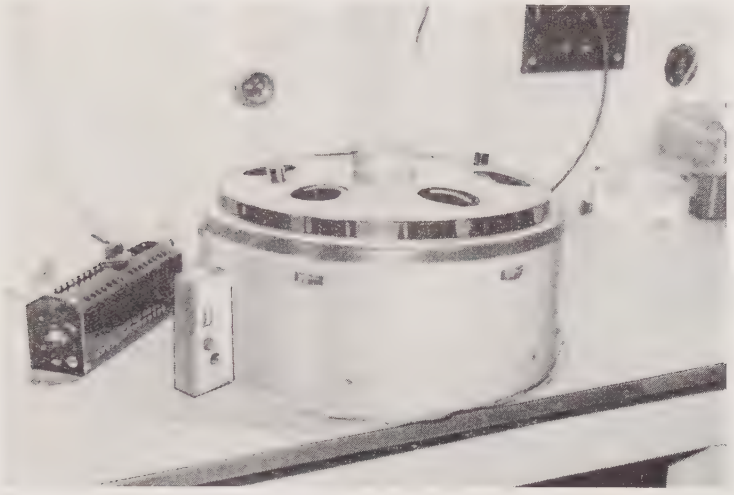


Fig. N° 4

Enceinte thermostable.

Mode d'emploi:

On fixe le tableau d'enregistrement verticalement à un mur et l'enceinte thermostatée sur un support stable et horizontal. On place l'enceinte thermostatée à gauche du tableau d'enregistrement. On enfonce la prise dans la position donnée par son ergot sur son embase et on visse à fond le collier à ailettes. Avant de relier l'appareil au secteur, vérifier si les interrupteurs sont bien dans la position levée. A ce moment, on nettoie soigneusement l'extérieur du boitier de l'enregistreur, afin qu'aucune poussière ne puisse pénétrer dans l'appareil en ouvrant ce boitier. Ouvrir l'enregistreur à l'aide de la clé à canon triangulaire. Nous insistons sur ce point : l'opération suivante doit être effectuée lentement, une manœuvre brusque du levier de verrouillage risquerait de détériorer les pivots du système mobile. Abaisser lentement le levier de verrouillage, placé sur la droite du châssis, ce qui a pour effet de libérer l'aiguille du système de mesure, de débloquer l'aiguille double, de fermer le contact d'alimentation du moteur synchrone, de verrouiller le châssis mobile porte-diagramme.

L'aiguille du galvanomètre étant ainsi libérée, on règle le zéro mécanique de l'appareil en déplaçant doucement le levier rouge située au-dessus du cadran, soit vers la droite, soit vers la gauche. Fermer l'enregistreur, il est prêt à fonctionner.

Vérifier si la tension du secteur correspond à celle portée sur la plaque indicatrice située sur le socle, côté droit, de la boîte d'alimentation.

Enfoncer la prise positionnée suivant un ergot repéré par un point blanc dans son embase. Brancher l'autre extrémité du cordon sur la prise de secteur. Il est recommandé de raccorder la vis avec écrou molette à une bonne prise de terre. Abaisser alors l'interrupteur général, la lampe doit s'allumer. La mise en marche du chauffage régulé s'effectue par abaissement de l'interrupteur, le voyant s'allume et indique que la tension est aux bornes du système du chauffage.

Pour le réglage de la température, on disposera tout d'abord le thermomètre à sa place prévue, on dévisse le bouton A gradué du régulateur de quelques tours dans le sens « + ». Le voyant B s'allume. Lorsque la température indiquée par le thermomètre est inférieure de 2° à celle désirée, tourner le bouton A dans le sens « — », jusqu'à extinction du voyant B. Il faudra prendre soin de ne pas dépasser ce point, car le régulateur étant très sensible, une très petite déviation du bouton gradué entraîne une variation importante de température. Attendre une dizaine de minutes pour que la température se stabilise, puis la corriger, s'il y a lieu, à l'aide du bouton molette, et en tenant compte du fait que la distance séparant deux chiffres gravés représente sensiblement 6°. Pour une même position du bouton, on obtiendra toujours la même température. Cependant, pour tenir compte de la légère usure des contacts dans le régulateur, il faudrait vérifier le règlage de temps en temps.

Il peut arriver que la température indiquée par le thermomètre et celle du liquide placé dans les cuves soient légèrement différentes (au maximum 2°). Cette différence est constante, il suffira d'en prendre note et de règler en conséquence les cuves thermostatiques. Cette différence est due au léger échauffement des bobines d'agitation magnétique. Par contre selon le fabricant, la température des différentes cuves est toujours la même, à ± 0,2° près. Nous aurons l'occasion de revenir sur cette question de réglage de la température.

Pour la mise en marche de l'agitation magnétique, il faut abaisser l'interrupteur; le réglage de la vitesse se fait par un bouton spécial et celui de l'intensité par un autre bouton, après avoir mis en place les cuves avec leur barreau d'agitation.

Pour le réglage initial du départ des courbes et les autres précautions à prendre, nous en renvoyons au travail de Durrer (24).

Mesure du dégagement gazeux au moyen du tube de Besson modifié :

On introduit dans un tube de culture 5 cc de milieu liquide puis on y dispose un tube renversé de 6 cm de long et de 0,6 cm de diamètre d'une contenance de 1,5 cc et gradué au 10e, comme nous l'illustrons par le schéma ci-après :

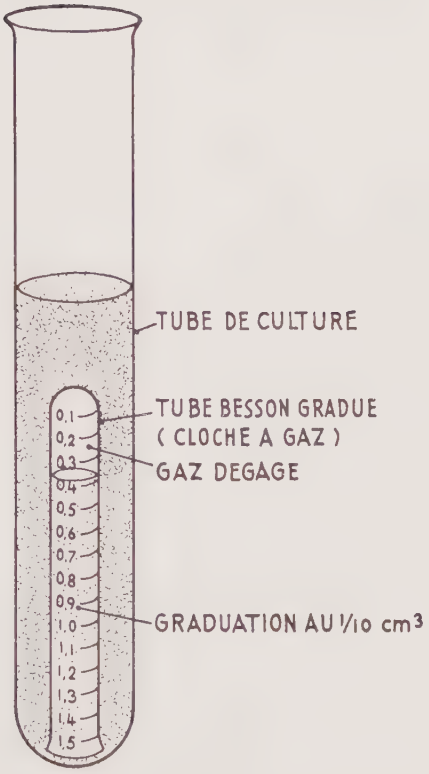


Fig. N° 5
Tube de Besson gradué.

Au cours de la stérilisation, ce tube renversé se remplit automatiquement de milieu, et après refroidissement il fait cloche à gaz, permettant d'évaluer la quantité de gaz qui se développe dans un temps donné.

Les tubes ainsi préparés sont ensemencés avec *une suspension homogène et de degré turbidimétrique toujours identique de Zymomonas mobile Lindner;* pour ce faire, on utilise une pipette de Pasteur jaugée à 20 gouttes par centimètre cube. Il faut veiller à ce que la quantité de milieu nutritif dépasse la cloche à gaz, ce qui permet de lire avec facilité le niveau du gaz développé.

Méthode de contrôle au moyen des boîtes de Pétri:

A cet effet nous avons eu recours à des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre. Pour contrôler le développement de *Zymomonas mobile*, nous avons introduit dans le milieu de culture des *tablettes de Drigalski*, permettant d'évaluer le virage du pH par l'apparition d'une teinte orange à pH = 4,8, rouge à 5,4 et violette à 6,8. Nous reviendrons sur les détails de ces essais.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES

Dosage des Biostimulines par le contrôle du dégagement gazeux :

En nous basant sur les travaux de FAUDI, nous avons essayé de contrôler la croissance de *Zymomonas mobile* par une méthode aussi simple que possible, en évaluant quantitativement le gaz carbonique mis en liberté. On peut poser comme principe que *plus il y a de facteurs biostimulants, plus la croissance démarre vite et par conséquent plus le dégagement gazeux est précoce.*

La quantité de gaz mise en liberté dans un temps donné permet ainsi de déterminer le taux de Biostimulines.

Nous avons par conséquent introduit 5 cc de notre milieu liquide à double concentration dans des tubes standardisés, puis on ajoute, avec les garanties d'asepsie nécessaires, les quantités d'extrait biogène à tester et on complète à 10 cc au moyen d'eau distillée. On introduit alors la cloche à gaz et on tyndallise, puis on ensemence le *Zymomonas mobile* comme nous l'avons précédemment indiqué, en partant d'une culture-mère âgée de 24 heures. On dispose la gamme de tubes à 27° et on contrôle la croissance de la bactérie en rapport avec la quantité de gaz développée après 12 - 24 - 36 et 48 heures.

Tout d'abord on détermine par tâtonnements la quantité d'extrait biogène se prêtant le mieux à ces conditions expérimentales, puisque si la dose de *Biostimulines* est trop petite, le temps d'expérience est trop prolongé ; si les doses sont trop fortes, elles peuvent interrompre prématurément la croissance par un processus de bactériolyse.

Pour ces essais préliminaires, nous avons employé un *extrait de germes de maïs* préparé selon les indications de FAUDI et que nous avons utilisé comme référence dans nos expériences ultérieures. Il s'agit d'*une macération aqueuse à* 20 % *de germes de maïs de la Maison* DUMORTIER.

Nous avons établi une gamme contenant 0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 5,0 cc de cet extrait de germes de maïs. Cette expérience nous a donné les résultats suivants :

TABLEAU N° 4

Extrait de germes de maïs cc	Temps en heures							
	12	24	36	48	60	72	84	96
0,5	—	—	—	3/15	10/15	11/15	—	—
1,0	—	—	2/15	7/15	11/15	14/15	15/15	—
2,0	—	1/15	4/15	10/15	15/15	—	—	—
3,0	±	5/15	10/15	15/15	—	—	—	—
5,0	±	5/15	8/15	13/15	15/15	—	—	—

Toutes les expériences ont été effectuées en cinq séries et les valeurs indiquées dans le tableau représentent la moyenne de ces 5 essais. Nous faisons remarquer que ces expériences préliminaires ont été effectuées au moyen du milieu Difco initialement à double concentration et sans addition supplémentaire de glucose; plus tard, nous avons obtenu une croissance beaucoup plus rapide par l'adjonction de ce sucre.

Après avoir ainsi constaté que 3 cc de notre extrait à 20 % de germes de maïs fournissaient les meilleurs résultats, nous avons employé cette dose comme témoin dans nos expériences ultérieures, pratiquées au moyen de préparations d'extraits placentaires du commerce que nous avons ajustés à 20 % environ en nous référant aux indications du fabricant.

Méthode biophotométrique:

Partant de la méthode de mesure du dégagement gazeux, nous avons établi notre technique biophotométrique, en nous servant de *l'appareil Bonet-Maury*. Pour celle-ci, ce n'est pas le dégagement gazeux qu'on mesure, *mais le développement de la bactérie-test en rapport direct avec la Biostimuline.* La croissance des germes occasionne un trouble directement proportionnel au développement, que l'on peut mesurer au moyen de la cellule photoélectrique.

Mode opératoire:

Nous avons introduit dans les cuves standard de *l'appareil Bonet-Maury* le même substrat que précédemment; l'appareil permet de doser simultanément cinq concentrations différentes de la même *Biostimuline* et un témoin dépourvu de l'extrait biogène.

Nous avons tout d'abord employé les concentrations suivantes de notre extrait à 20 % de germes de maïs : 0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0 et 5,0 cc.

Au cours de nos premiers essais, nous avons enregistré un insuccès complet, ce qui nous a permis de constater que le milieu nutritif atteignait une température de 45° à l'intérieur de l'appareil au cours des premières douze heures malgré l'indication de 27° au thermomètre de contrôle. D'autre part, pour stériliser les cuves, nous avions employé des bouchons en caoutchouc, puisque ceux en coton cardé inhibaient la croissance du *Zymomonas*. Par ce bouchage, le gaz carbonique ne peut pas s'échapper et il se produit à l'intérieur des cuves une surpression qui est défavorable au développement de la bactérie.

Pour remédier à cet état de choses, nous avons modifié notre appareillage en stabilisant la température à 27° et en munissant les bouchons de caoutchouc d'une *aiguille hypodermique* qui permet l'évaculation du CO^2.

Nous donnons ci-après trois photographies illustrant les modifications apportées à nos appareils :

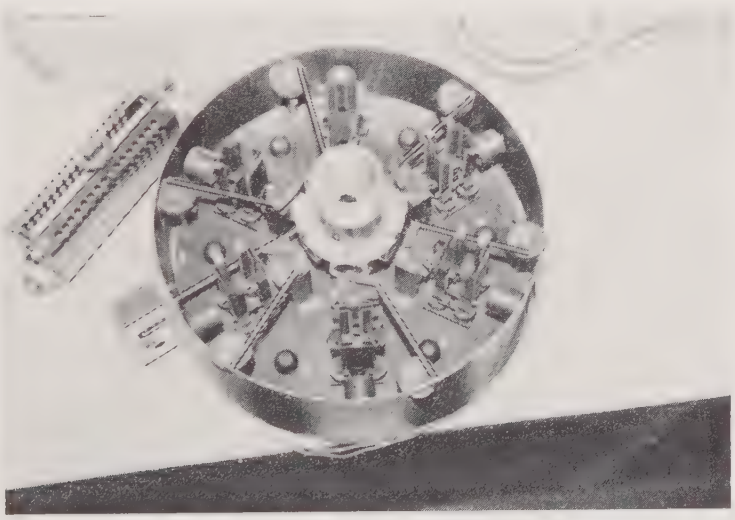


Fig. N° 6

Disposition de deux cuves juxtaposées dans l'enceinte thermostable du biophotomètre.

Pour stabiliser la température, nous avons introduit entre la cuve en expérience et la lampe d'éclairage *une deuxième cuve de 1 cm de diamètre périodiquement remplie d'eau froide*. Les bouchons en caoutchouc munis de l'aiguille hypodermique sont fixés au moyen d'une bande de leucoplast sur le col de la cuve, la fermant hermétiquement.

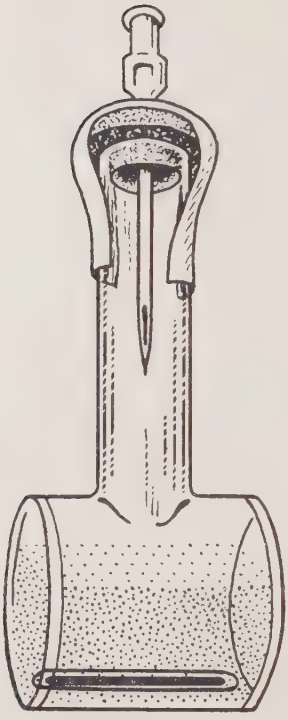


Fig. N° 7

Une cuve de culture adaptée à nos conditions expérimentales.

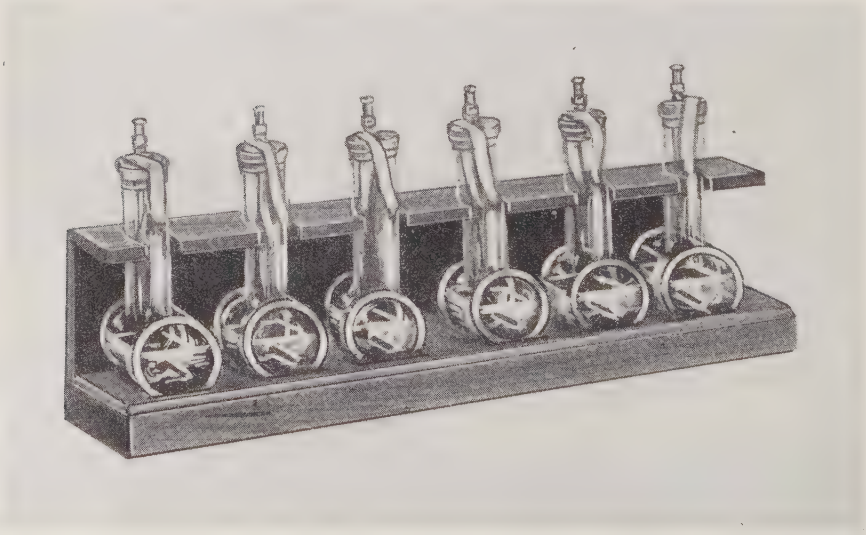


Fig. N° 8

Support avec les six cuves de culture munies de fermeture à bouchon caoutchouc et d'une aiguille hypodermique.

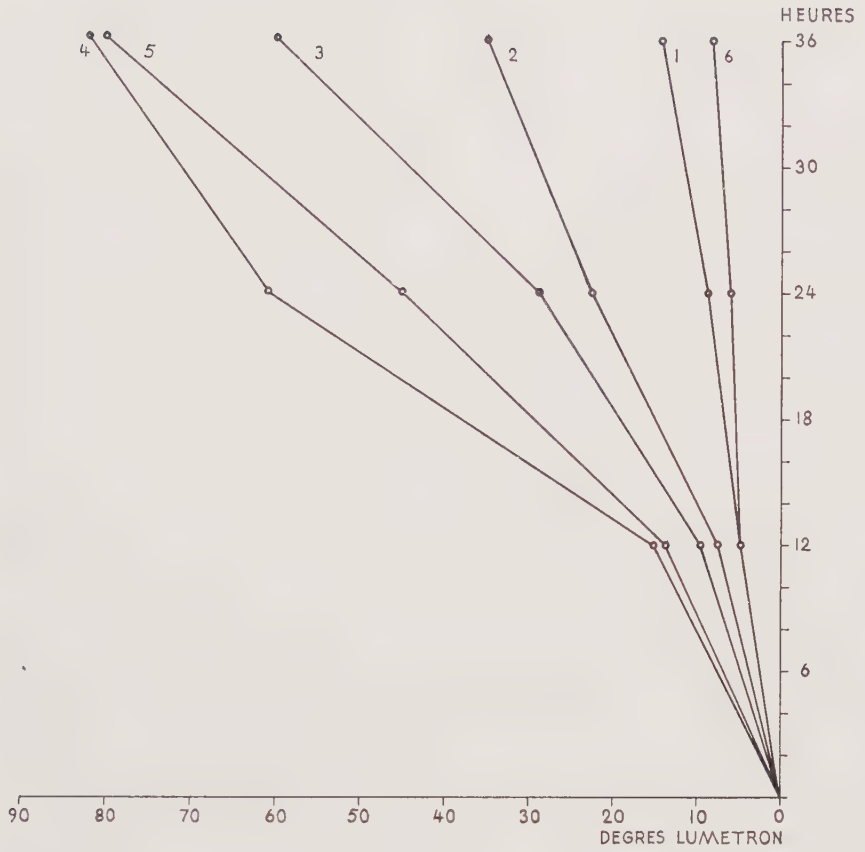


Fig. N° 9

Graphique montrant les courbes de croissance de Zymomonas mobile en rapport avec les doses de 0,5 (courbe 1) — 1,0 (courbe 2) — 2,0 (courbe 3) — 3,0 (courbe 4) — 5,0 (courbe 5) cc d'extrait de germe de maïs à 20 % et le milieu témoin (courbe 6).

Ces modifications nous ont permis d'obtenir des résultats satisfaisants, comme cela ressort du *graphique N° 9*.

Si l'on compare les résultats de ce graphique avec ceux enregistrés antérieurement dans le tableau N° 4, *on constate que les courbes néphélométriques évoluent plus rapidement que le dégagement de gaz.* Ce fait s'explique facilement par l'amorcement du dégagement gazeux qui se manifeste seulement au moment où le nombre de germes est suffisant pour amener des modifications chimiques du milieu. On peut constater macroscopiquement le même fait, en observant les tubes de culture où le trouble apparaît bien avant le dégagement de CO^2.

Méthode en boîtes de Pétri:

Comme nous avons pu le constater lors des expériences ayant trait au contrôle du dégagement gazeux et à la méthode biophotométrique, *la modification de la concentration ionique du milieu de culture est en rapport direct avec le développement et la croissance de la bactérie-test.* Ainsi, dans l'expérience au moyen de 3 cc d'extrait de germe de maïs, le pH va de 6,8 à 4,1 en 36 heures, alors qu'avec 2 cc d'extrait de germe de maïs, il se situe à 4,5 et avec 1 cc d'extrait à pH = 4,9 dans les mêmes conditions expérimentales. *Ces exemples prouvent qu'il existe une relation étroite entre la croissance de la bactérie-test et le pH qui dépend du gaz carbonique dégagé.*

Nous avons effectué un certain nombre d'essais préliminaires pour déterminer le milieu et l'indicateur appropriés.

Dans une première série d'expériences, nous avons employé 100 cc de *milieu Difco* additionné de 2 % de gélose et d'une tablette de Drigalski (*Merck*). Le milieu ainsi constitué est stérilisé, puis coulé à raison de 15 cc dans des boîtes de Pétri stériles. On laisse solidifier, puis on ensemence avec toutes les précautions d'asepsie au moyen d'une suspension de la bactérie-test que l'on répartit d'une façon homogène à la surface du milieu au moyen d'une spatule en verre. A ce moment, on découpe aseptiquement des trous de 8 mm de diamètre à l'emporte-pièce, à 20 mm les uns des autres. Ces réservoirs sont destinés à recevoir les différentes dilutions d'extraits biogènes en étude. On dispose ensuite à l'étuve à 27° et on contrôle la croissance de la bactérie et le virage éventuel de teinte de l'indicateur. *Dans cette première expérience, ce phénomène est resté négatif* et nous croyons pouvoir expliquer ce résultat par le fait que le milieu contient environ 2,5 % de tampon stabilisant la concentration ionique.

Dans une deuxième série d'expériences, *nous avons mélangé l'extrait biogène directement avec le milieu Difco*, puis on laisse solidifier et on ensemence par la suspension de la bactérie-test. Cette technique ne nous a pas donné de résultats satisfaisants.

Dans une troisième série, nous avons modifié le milieu de culture en employant à la place du milieu Difco *un moût de bière non houblonné gélosé à* 2 %. Nous y avons introduit, comme précédemment, une tablette de Drigalski, nous y avons percé des réservoirs pour recevoir les différentes dilutions d'extrait biogène et avons ensemencé avec la bactérie-test. *Cet essai nous a donné un résultat positif par le virage de l'indicateur*, ce qui prouve que le moût de bière, bien que possédant par lui-même des *facteurs biostimulants*, est susceptible d'être enrichi par des *Biostimulines hétérogènes* que l'on peut évaluer par le virage plus ou moins prononcé de la concentration ionique du milieu de culture sous l'influence de la croissance bactérienne.

Après ces essais préliminaires, nous avons établi *notre technique définitive.* Nous avons préparé le milieu suivant :

Moût de bière non houblonné	200 cc
Glucose	8 g
Bacto Agar Difco	4 g
Tablettes Drigalski Merck	2 pièces

On chauffe jusqu'à dissolution complète et on ajuste le pH à 6,8 au moyen de NaOH à 10 %. On tyndallise à 100° pendant une heure et deux jours consécutifs. On répartit ensuite le milieu encore liquide à raison de 15 cc dans des tubes de culture stériles, on laisse refroidir à 68°-70°, puis on introduit dans les tubes les différentes dilutions de l'extrait biogène en expérience. Chaque gamme comporte un tube témoin ne contenant pas d'extrait biogène. On mélange soigneusement et on coule dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre en maintenant la température entre 50° et 56°. On laisse solidifier, puis on perce au centre de la plaque un trou de 0,5 cc de contenance à l'aide d'un emporte-pièce; on y introduit 6 gouttes d'une suspension de *Zymomonas mobile* âgée de 24 heures, on dispose à 27° pendant 48 heures et on évalue la croissance et le virage. Cette méthode est semi-quantitative; nous y reviendrons dans le chapitre suivant.

Il est curieux de constater la *configuration irrégulière* de la plage autour du réservoir central, qui provient de la coissance irrégulière de la bactérie et du dégagement de CO^2 dans la couche gélosé.

Après avoir mis nos méthodes au point, nous donnons dans le chapitre suivant les explications concernant l'interprétation de nos résultats et les courbes qui en résultent.

CHAPITRE IV

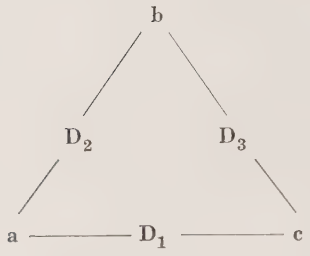
DOSAGE DE DIVERS EXTRAITS PLACENTAIRES

Pour le dosage biophotométrique nous avons employé l'*appareil Bonet-Maury*, en contrôlant simultanément quatre extraits placentaires différents, une cuve étant réservée à *l'extrait de germe de maïs, Biostimuline de référence* (TM = témoin maïs) et la dernière ne contenant que le milieu de culture et de l'eau distillée (TE = témoin eau). Ces deux témoins figuraient également dans chaque série de contrôle du dégagement gazeux.

Nous avions à notre disposition différents échantillons d'extraits placentaires d'origine française, allemande et suisse (*Mérieux*, *Merz*, *Labopharma*, *Institut Sérothérapique et Vaccinal Suisse*, *Lucchini*). Nous somme obligé de désigner ces divers échantillons par des numéros conventionnels, et restons à la disposition des Maisons intéressées pour leur donner tous renseignements concernant leurs produits respectifs.

Les premières expériences ont été effectuées avec 3 cc d'une dilution à 10 % d'un extrait placentaire N° 0365; les deux cuves témoins contenaient respectivement 3 cc de notre extrait de maïs (TM) et 3 cc d'eau distillée (TE). Toutes les cuves ont été ensemencées au moyen de 8 gouttes d'une suspension de *Zymomonas* âgée de 24 heures, comme nous l'avons indiqué plus haut. La cuve témoin contenant 3 cc d'extrait de germe de maïs à 20 % a été arbitrairement évaluée à 100 unités. Pour calculer *les unités de Biostimulines* des extraits en expérience, nous sommes parti du raisonnement suivant :

On détermine le point O au moyen du témoin dépourvu de Biostimuline; dans l'expérience présente, ce tube a donné 87° L. L'opacité maximale fournie par l'extrait de germe de maïs à 20 % était de 6° L. La différence entre ces deux valeurs est de 81° L que nous considérons comme 100 U. Les 3 cc de l'extrait placentaire 0365 donnaient dans les mêmes conditions une opacité maximale de 14° L. La différence entre le témoin stérile et l'extrait 0365 est donc de 73° L. Pour évaluer les unités correspondant à 73° L, nous avons établi le schéma suivant :



L = degrés Lumetron
D = Différence
U = Unités
a = extrait de germes de maïs à 20 % = 6°L
b = extrait 0365 = 14°L
c = témoin stérile = 87°L

$b - a = D_2$ = 8°L
$c - b = D_3$ = 73°L
$c - a = D_1$ = 81°L = 100 U.

Si 81° L = 100 U, 73° L = 90,1 U. Ce calcul a été appliqué dans toutes nos expériences suivantes.

Les conditions expérimentales définies lors de nos essais préliminaires nous ont permis d'obtenir le maximum d'opacité avec 3 cc d'extrait de germe de maïs à 20 % après 12 heures. Nous avons donc toujours effectué la lecture des résultats à ce moment. Nous donnons dans le graphique N° 10 les trois courbes résultant de cette expérience.

Nous avons inscrit en ordonnée les heures d'expérience et en abscisse les degrés Lumetron.

Par la suite nous avons employé les dilutions suivantes de l'extrait 0365 : 5 % - 10 % - 20 % et 50 % et obtenu les courbes reproduites dans la figure N° 11 (voir page 40).

TABLEAU N° 5

Produit	Degrés Lumetron	Unités biogènes
TM	81	100
50 %	76	94
20 %	74	91,2
10 %	62	76,6
5 %	12	9,1

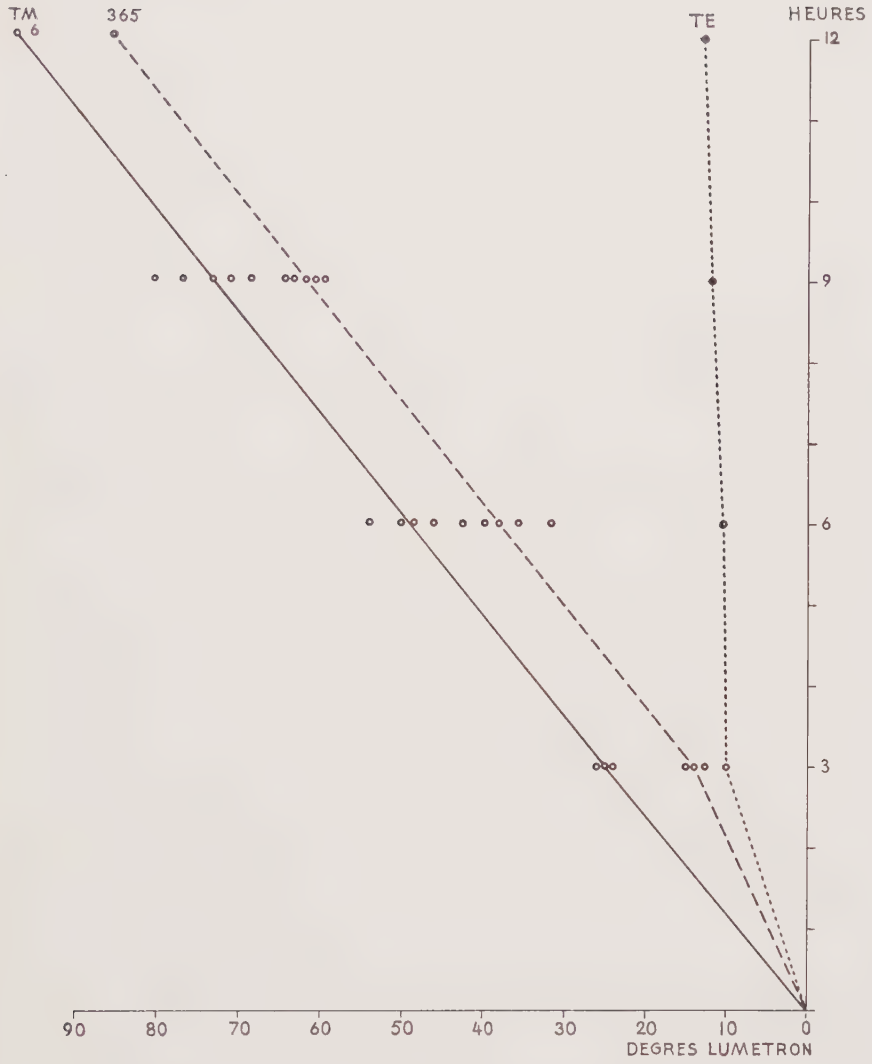


Fig. N° 10

Graphique montrant les courbes de croissance de Zymomonas mobile en rapport avec notre extrait de germe de maïs, un extrait placentaire et le témoin.

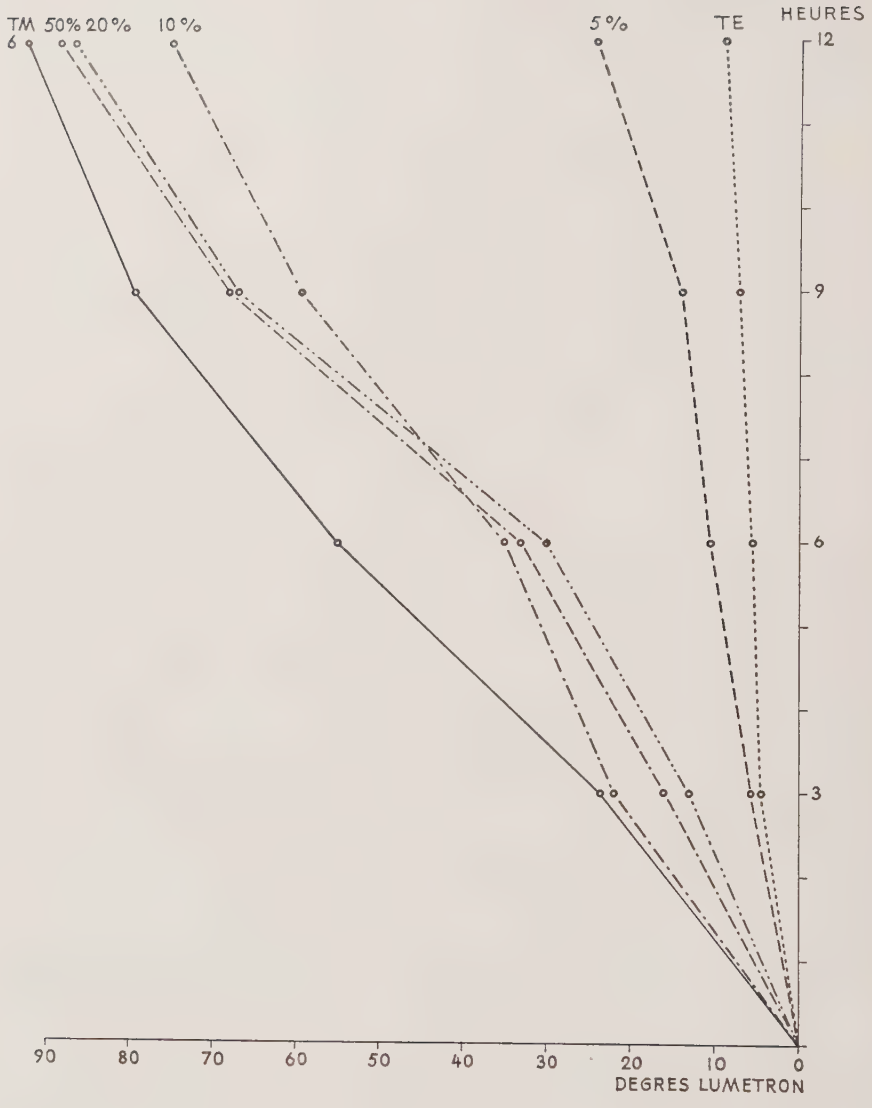


Fig. N° 11

Graphique montrant les courbes de croissance de Zymomonas mobile en rapport avec différentes dilutions de l'extrait placentaire N° 0365.

On voit ainsi que dans les deux séries d'expériences 3 cc d'extrait de germe de maïs à 20 % (TM) donnent un résultat sensiblement identique, et son emploi comme référence est pleinement justifié.

La courbe (Fig. N° 10) obtenue avec la solution-mère de l'extrait 0365 indique *une action nuisible sur la prolifération microbienne*, de sorte qu'après 12 heures d'expérience, le nombre des unités biogènes est plus faible qu'avec la dilution à 50 $^{0}_{0}$ et à 20 $^{0}_{0}$. En considérant la figure N° 11 on constate que ces deux dernières courbes sont sensiblement identiques. La dilution à 10 $^{0}_{0}$ fournit encore une activité biogène très marquée; l'importance des doses à employer dans ces différents essais résulte de l'évolution de la courbe de 10 % pendant les sept premières heures de l'expérience, où le développement de notre bactérie-test montre un optimum par rapport aux concentrations plus fortes.

Mesure du dégagement gazeux:

Pour exprimer les résultats, nous avons établi des graphiques dans lesquels nous enregistrons les hauteurs du dégagement gazeux dans les cloches par des verticales graduées au 15e. Chaque série comporte trois tubes dont le premier contient le TM, le second l'extrait 0365 et le troisième le TE. Le dégagement gazeux est contrôlé de 0 à 48 heures.

En reliant les sommets des verticales de chaque tube correspondant, on obtient une courbe exprimant le développement gazeux en rapport avec le temps.

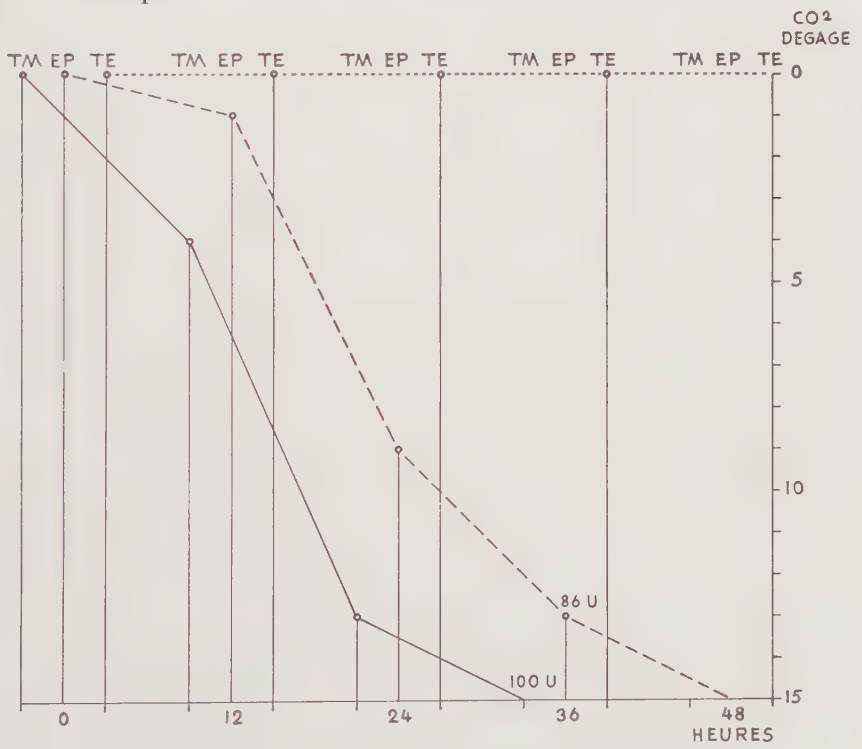


Fig. N° 12

Graphique illustrant les résultats de la méthode gazométrique.

On peut ainsi évaluer l'activité biogène de chaque extrait placentaire en étude par rapport à celle de l'extrait de germe de maïs (TM).

Cette expérience nous montre que la lecture peut être effectuée après 36 heures, puisque le dégagement gazeux de l'extrait de germes de maïs atteint 15 /15e (= 100 U); à ce moment l'extrait 0365 atteint 13 /15e (86 U).

En comparant ces résultats avec ceux obtenus par la méthode turbidimétrique, on voit qu'ils sont concordants dans les limites des méthodes biologiques mises en œuvre.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0366:

Macroscopiquement, il s'agit d'un *extrait mou*, jaunâtre, soluble dans l'éther. Pour préparer la solution-mère, nous avons dissous 1 g de l'extrait dans 50 cc d'éther, puis on y ajoute 30 cc d'eau distillée et l'on agite le tout sur un agitateur électrique pendant une heure. On transvase dans une ampoule à décantation, on laisse reposer jusqu'à séparation des deux phases et l'on soutire la phase aqueuse. Le résidu éthéré est épuisé encore deux fois au moyen de 10 cc d'eau distillée suivant la même technique. Finalement, nous avons réuni les trois extraits aqueux, nous avons chassé les dernières traces d'éther en portant dans un bain-marie. L'extrait aqueux est ensuite conservé pendant trois jours à la glacière, puis filtré à travers un filtre de Seitz. Le filtrat légèrement opalescent ainsi obtenu est employé comme solution-mère pour les dosages.

Dosage biophotométrique:

Ce dosage est effectué selon le même protocole expérimental que précédemment, en comparant la courbe de croissance de *Zymomonas* en milieu contenant 3 cc de la solution-mère de notre extrait placentaire, avec celle en présence d'un milieu à 3 cc d'extrait de germes de maïs à 20 %. Le second témoin était additionné de 3 cc d'eau distillée.

D'après les définitions établies antérieurement, nous trouvons :

$$b - a = 55 - 6 = 49^{o}\ L$$
$$c - b = 87 - 55 = 32^{o}\ L$$
$$c - a = 87 - 6 = 81^{o}\ L = 100\ U$$

donc : 32° L = 40 unités de Biostimulines pour l'extrait 0366.

Mesure du dégagement gazeux:

En considérant le graphique N° 13, on constate qu'après 36 heures, le dégagement gazeux pour l'extrait placentaire 0366 est de 7 /15e = 46 U.

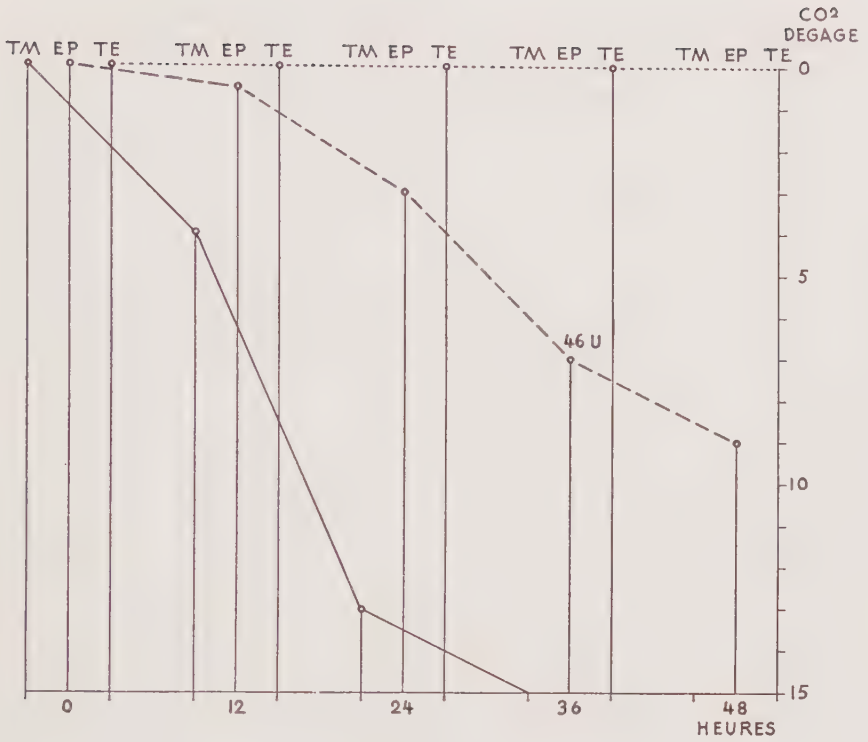


Fig. N° 13

Contrôle gazométrique de l'activité de l'extrait placentaire N° 0366.

Les résultats des deux dosages sont sensiblement comparables.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0367 :

Il s'agit ici d'un *extrait placentaire solubilisé dans l'alcool:* la solution est jaune, limpide. Cet extrait se dilue dans l'alcool en toutes proportions. En essayant d'obtenir une solution aqueuse, il se forme une suspension laiteuse, jaunâtre, ne se prêtant pas aux mesures turbidimétriques. Le procédé d'extraction que nous avons mis en œuvre était identique à celui de l'expérience précédente: les 50 cc de suspension aqueuse finalement obtenus sont dilués à 1/20 au moyen d'eau distillée; on obtient ainsi un liquide opalescent qui ne donne pas de dépôt au cours de la conservation et qui permet des mesures au *biophotomètre Bonet-Maury*, malgré sa légère opalescence. Pour les mesures, nous avons préparé une solution-mère en partant de 2,5 g d'extrait placentaire 0367 dilués dans 47,5 cc d'eau distillée. Nous donnons ci-dessous les résultats de ces dosages :

Dosage biophotométrique:

$$b - a = 69 - 6 = 63^{o}\ L$$
$$c - b = 87 - 69 = 18^{o}\ L$$
$$c - a = 87 - 6 = 81^{o}\ L = 100\ U$$

donc : 18^{o} L = 22 unités pour l'extrait 0367.

Mesure du dégagement gazeux:

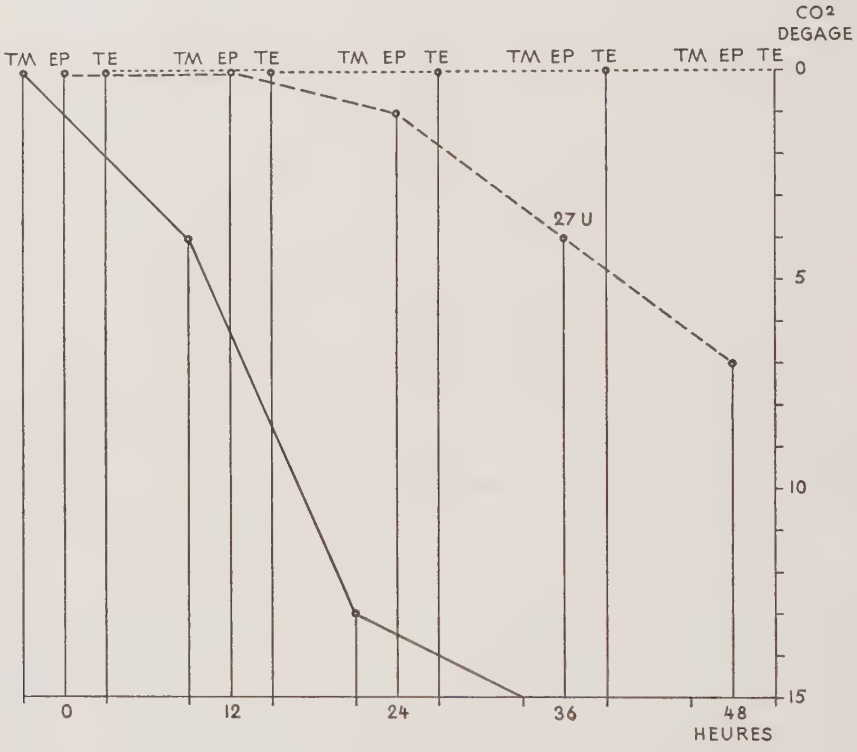


Fig. N° 14

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 0367.

Après 36 heures le dégagement gazeux de l'extrait placentaire 0367 est de 4 /15e = 27 U.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0369:

D'après le fabricant, il s'agit d'un *extrait mou total*; il se présente comme une masse brunâtre, à consistance de miel; la concentration doit être de 300 %. Il est soluble dans l'alcool en toutes proportions; si l'on

reprend l'extrait dans l'eau chaude, on obtient une suspension qui, après six heures d'agitation électrique et ultrafiltration à travers un filtre Seitz, donne une solution légèrement opalescente. La solution-mère a été préparée de la façon suivante : 2,5 g d'extrait placentaire 0369 sont introduits dans 47,5 cc d'eau distillée bouillante et le tout est agité pendant 6 heures. On laisse reposer pendant 3 heures à la glacière et on passe à l'ultrafiltration.

Dosage biophotométrique:

$$b - a = 4 - 6 = -2^{o}\ L$$
$$c - b = 87 - 4 = 83^{o}\ L$$
$$c - a = 87 - 6 = 81^{o}\ L = 100\ U$$

donc : 83^{o} L = 102 unités pour l'extrait 0369.

Mesure du dégagement gazeux:

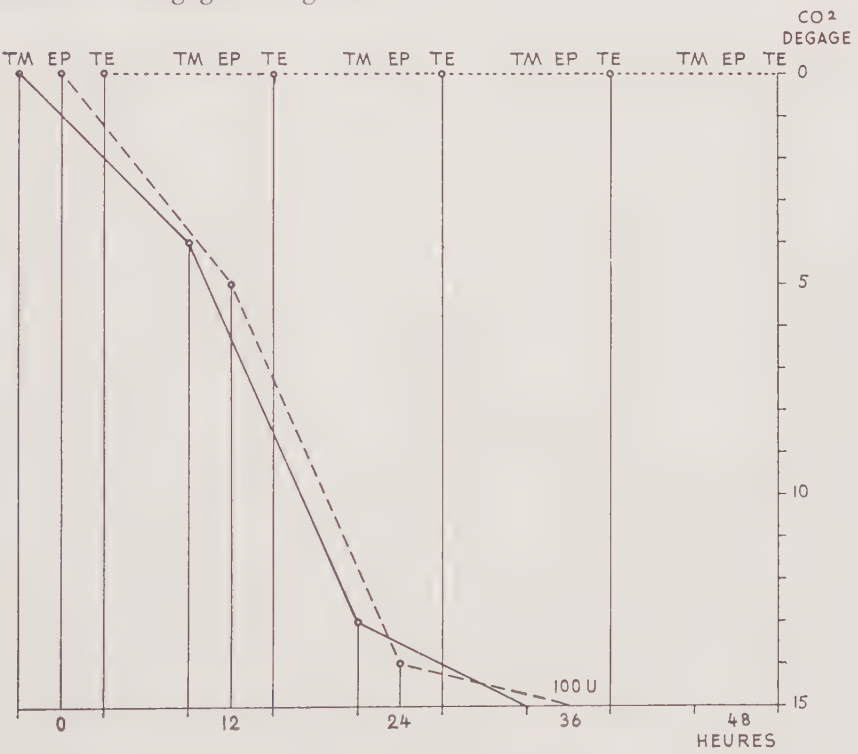


Fig. N° 15

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 0369.

Après 36 heures, le dégagement gazeux de l'extrait placentaire 0369 est de $15/15^{e} = 100$ unités.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0466:

Cet extrait total se présente *en solution dans l'huile d'olive avec le Tween comme mouillant*, ce qui permet le mélange de l'extrait avec de l'eau. Il s'agit d'un liquide jaunâtre, huileux, miscible à l'eau dans toutes les proportions.

Comme solution-mère, nous avons choisi une dilution à 20 % dans l'eau distillée.

Dosage biophotométrique:

$$b - a = 27 - 6 = 21^{o}\ L$$
$$c - b = 87 - 27 = 60^{o}\ L$$
$$c - a = 87 - 6 = 81^{o}\ L = 100\ U$$

donc : 60^{o} L = 75 unités pour l'extrait 0466.

Mesure du dégagement gazeux:

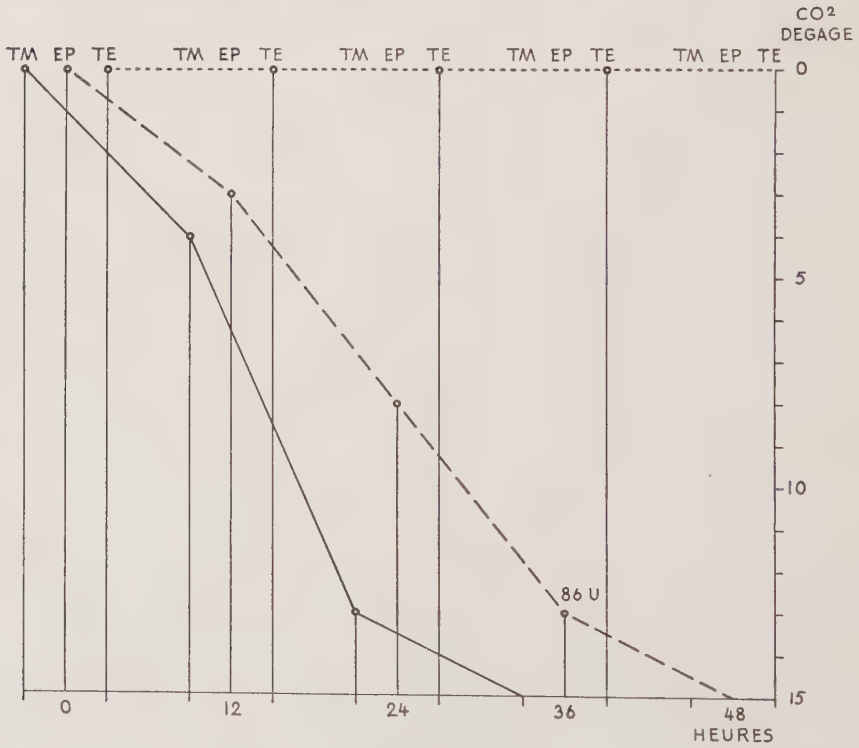


Fig. N° 16

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 0466.

Après 36 heures, le dégagement gazeux de l'extrait placentaire 0466 est de 13 /15e = 86 unités.

La discordance que nous notons entre les résultats du dosage biophotométrique et de la mesure du dégagement gazeux est à notre avis à mettre sur le compte d'un *phénomène d'autolyse* qui se manifeste à partir de la sixième heure d'expérience. C'est à ce moment que l'optimum de croissance est atteint et le trouble que nous avons mesuré entre la 6e et la 12e heure ne doit plus correspondre directement à la multiplication bactérienne. Comme la mesure du dégagement gazeux évolue plus lentement et que la lecture s'effectue après 36 heures, le phénomène de l'autolyse ne peut pas intervenir. *Ceci prouve l'importance des concentrations en extrait biogène à choisir, surtout en ce qui concerne la méthode turbidimétrique.*

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0368:

Il s'agit *d'un extrait total de placenta hydrosoluble*; il se présente sous forme d'un liquide épais miscible en toutes proportions avec l'eau.

Comme solution-mère, nous avons eu recours à une dilution à 20 % de cet extrait.

Dosage biophotométrique:

b — a = 16 — 6 = 10° L
c — b = 87 — 16 = 71° L
c — a = 87 — 6 = 81° L = 100 U

donc : 71° L = 88 unités pour l'extrait 0368.

Mesure du dégagement gazeux:

Après 36 heures, le dégagement gazeux de l'extrait placentaire 0368 est 13 /15e = 86 unités.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0370:

Cet extrait est constitué par *une solution aqueuse à* 20 % *de placenta*, contenant en plus 0,15 % *d'ester de l'acide para-oxybenzoïque* (*Nipagine-Nipasol*). L'extrait est tout-à-fait limpide, légèrement jaunâtre. Nous n'avons pas jugé nécessaire de préparer une solution-mère spéciale et avons effectué nos expériences avec l'extrait tel quel.

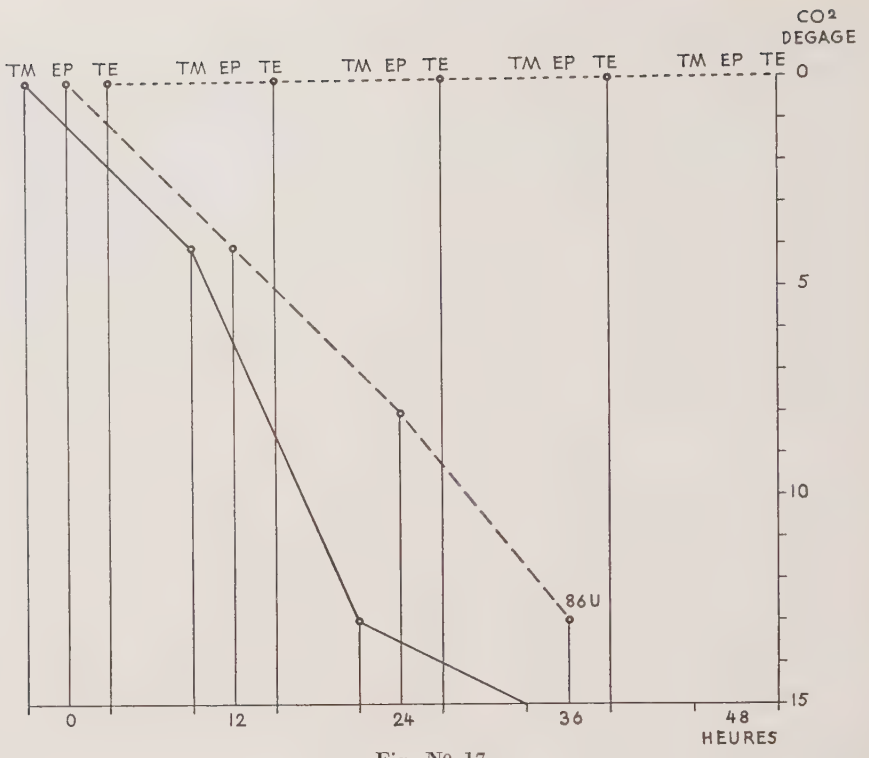


Fig. N° 17

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 0368.

Comme il fallait s'y attendre, *le développement de notre bactérie-test a été inhibé par l'antiseptique.* Nous illustrons ce résultat dans le graphique N° 18 concernant le contrôle gazométrique de l'activité biogène de cet extrait placentaire muni d'antiseptique.

On peut conclure de ces essais que nos méthodes biologiques de dosage de l'activité biogène sont inutilisables chaque fois qu'il s'agit *d'extraits conservés en présence d'un antiseptique.*

C'est pour cette raison que nous avons refait les dosages avec le même extrait placentaire dépourvu d'antiseptique à qui nous donnons le numéro 0371. Nous avons employé cet extrait tel quel, comme solution-mère.

Dosage biophotométrique:

$$b - a = 44 - 6 = 38^{o}\ L$$
$$c - b = 87 - 44 = 43^{o}\ L$$
$$c - a = 87 - 6 = 81^{o}\ L = 100\ U$$

donc : $43^{o}\ L = 54$ unités pour l'extrait 0371.

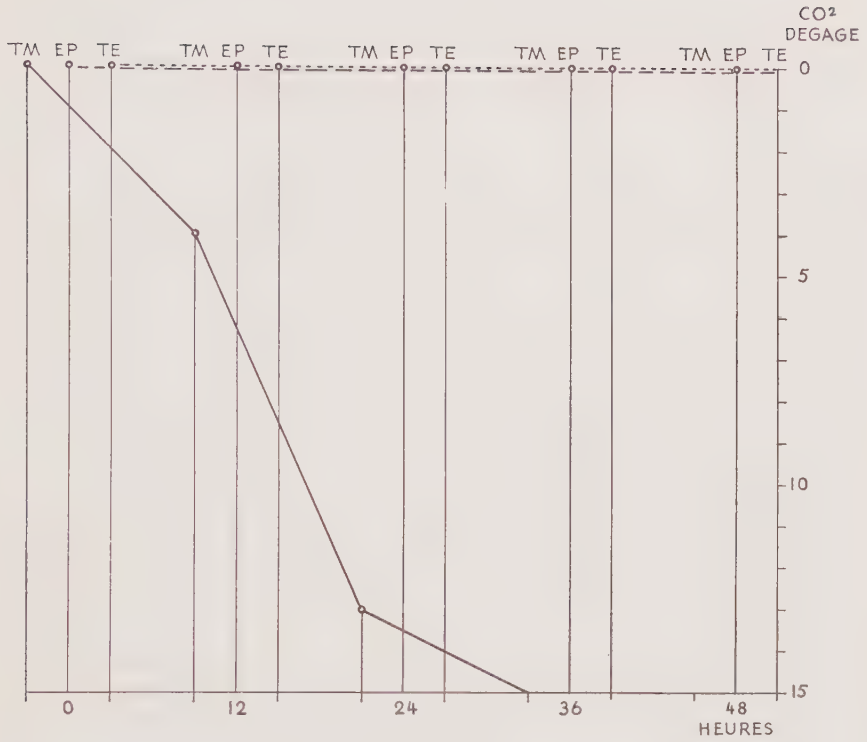


Fig. N° 18

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 0370.
La courbe de l'extrait 0370 évolue parallèlement à la courbe témoin (TE).

Mesure du dégagement gazeux:

Après 36 heures, le dégagement gazeux de l'extrait 0371 est de $7/15^{e} = 46$ unités (voir figure N° 19).

On voit ainsi que l'extrait en question contenait des substances biogènes, puisque le développement de la bactérie-test s'effectue dans de bonnes conditions en l'absence de l'antiseptique.

A titre documentaire, nous rapportons page 51 un graphique original (N° 20) de l'appareil Bonet-Maury, concernant six extraits placentaires différents :

Courbe N° 1 : extrait de germes de maïs à 20 % (TM)
Courbe N° 2 : extrait 0369
Courbe N° 3 : extrait 0365
Courbe N° 4 : extrait 0366

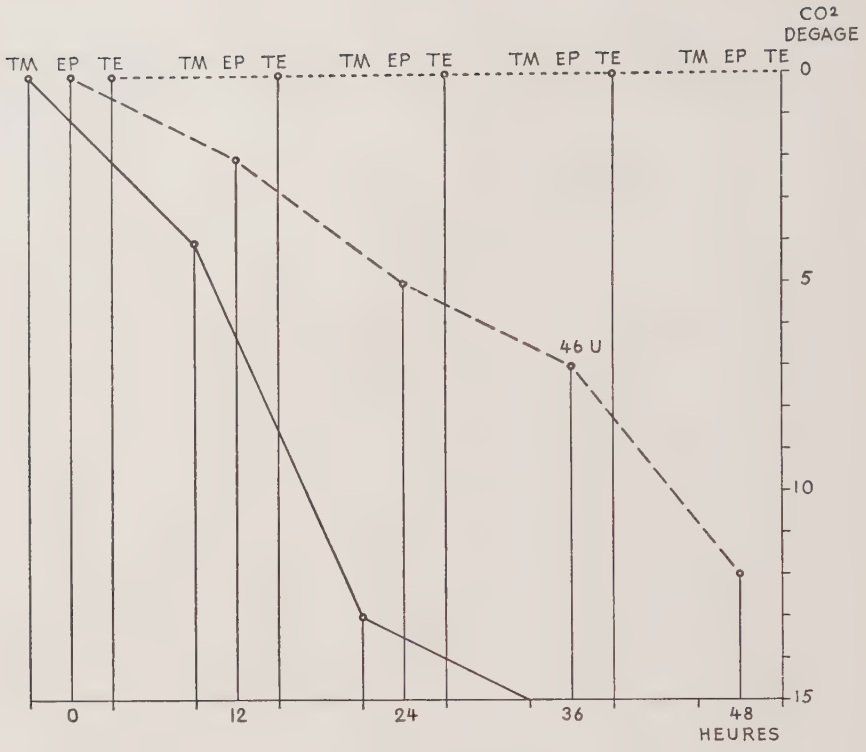


Fig. N° 19

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 0371.

Courbe N° 5 : extrait 0367
Courbe N° 6 : témoin eau distillée (TE).

Le biophotomètre a été réglé à un déroulement du papier enregistreur de 2 cm/heure; notons encore que les extraits ont été employés à des concentrations qui variaient d'une solution-mère à l'autre.

Afin d'exprimer l'activité réelle de chacun de ces extraits, nous avons établi un tableau d'ensemble où nous mentionnons les solvants, les concentrations des solution-mères, les valeurs trouvées et les valeurs calculées à 100 %.

On voit ainsi que l'activité biogène la plus marquée se trouve dans les extraits placentaires 0366 et 0369. Ces expériences permettent de conclure que les deux méthodes se prêtent au dosage de l'activité biogène et qu'en travaillant dans des conditions nettement définies, les résultats sont assez concordants. En ce qui concerne la méthode biophotométrique, nous tenons à attirer l'attention sur le fait que la dilution convenant

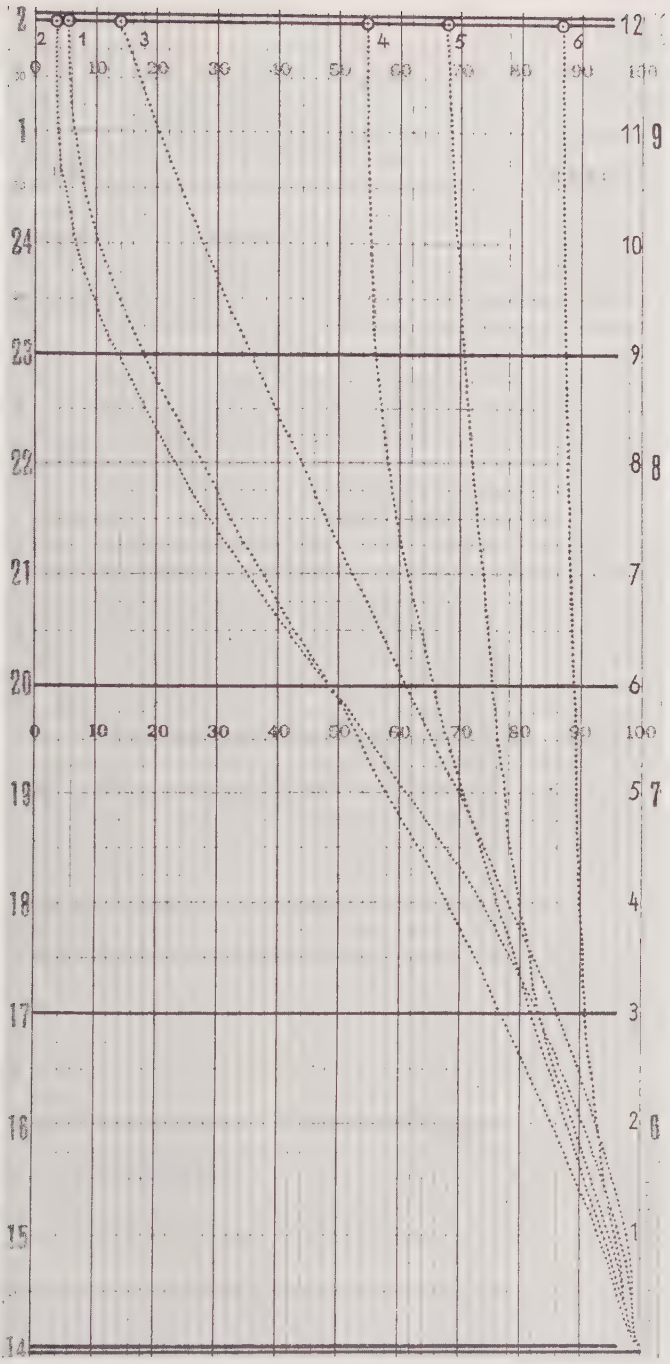


Fig. N° 20

Graphique documentaire des courbes enregistrées par le Biophotomètre de Bonet-Maury concernant six extraits placentaires.

au dosage est beaucoup plus importante que dans la méthode gazométrique, puisque des phénomènes frénateurs de l'activité biogène ou des processus d'autolyse jouent beaucoup plus facilement dans la première.

TABLEAU N° 6

Extrait N°	Solvant	Solution mère	Valeurs trouvées Unités		Valeurs calculées à 100 % d'extrait	
			Bioph.	Gazo	Bioph.	Gazo
0365	glycérine.....	10 %	91	86	910	860
0366	éther	2 %	40	46	2 000	2 300
0367	alcool	5 %	22	27	440	540
0368	eau	20 %	88	86	440	430
0369	alcool	5 %	102	100	2 040	2 000
0370	eau + antisept..	20 %	—	—		
0371	eau	20 %	54	46	270	230
0466	huile	20 %	75	86	375	430

Ici s'impose une remarque très importante. A première vue il semblerait que ce sont les extraits éthérés et alcooliques qui sont les plus actifs, alors que nous avons toujours constaté lors de la préparation de nos extraits biogènes que les extractions au moyen de solvant aqueux fournissaient les produits biogènes les plus efficaces en clinique. Pour élucider ce problème nous avons pris des renseignements plus détaillés auprès des fabricants.

La maison Merz, de Francfort (Allemagne) a alors bien voulu nous préparer divers extraits aqueux, glycérinés, éthérés, alcooliques et huileux. Nous donnons ci-après quelques exemples de dosages de l'activité biogène de ces divers extraits placentaires, qui ont donné les résultats suivants avec nos deux méthodes :

Les extraits 2, 3, 4 ont été préparés à partir d'un même prélèvement de placenta successivement traité à l'éther (2), au méthanol (3) et à l'eau (4). On voit ainsi que les Biostimulines sont épuisées en majeure partie par l'eau, alors que l'éther et le méthanol n'ont permis l'extraction que d'une très faible part, ce qui confirme nos constatations antérieures sur la solubilité optimale des Biostimulines dans l'eau.

TABLEAU N° 7

Extrait N°	Solvant	Concentration de l'extrait placentaire	Solution mère	Valeurs trouvées Unités		Valeurs calculées pour extrait d'une concentration de 100/1	
				B	G	B	G
1	glycérine ...	5/1	10 %	91	86	364	344
2	éther	100/1	2 %	40	46	40	46
3	alcool	30/1	5 %	22	27	28	36
4	eau	1/5	20 %	88	86	4400	4300
5	alcool	24/1	5 %	102	100	170	166
6	eau + antisept..	1/10	20 %	—	—	—	—
7	eau	1/10	20 %	54	46	5400	4600
8	huile	1/5	20 %	75	86	3750	4300

Ces résultats prouvent que le contrôle de produits pharmaceutiques biogènes n'est possible qu'en connaissance de tous les détails de leur origine et leur mode de préparation. Les valeurs indiquées dans le tableau N° 6 doivent donc être corrigées et interprétées selon les données ainsi établies.

Nous avons alors entrepris une nouvelle série d'essais avec d'autres produits du commerce.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 2097:

D'après le fabricant, nous avons affaire à *un extrait placentaire aqueux* à 100 %, ne contenant pas d'antiseptique. Macroscopiquement, il s'agit d'une solution limpide, incolore. Après de nombreux essais, nous avons constaté qu'une dilution à 20 % se prête le mieux pour nos dosages.

Dosage biophotométrique:

$$b - a = 24 - 14 = 10^{\circ}\ L$$
$$c - b = 87 - 24 = 63^{\circ}\ L$$
$$c - a = 87 - 14 = 73^{\circ}\ L = 100\ U.$$

donc : 63° L = 87 unités pour l'extrait 2097.

Mesure du dégagement gazeux:

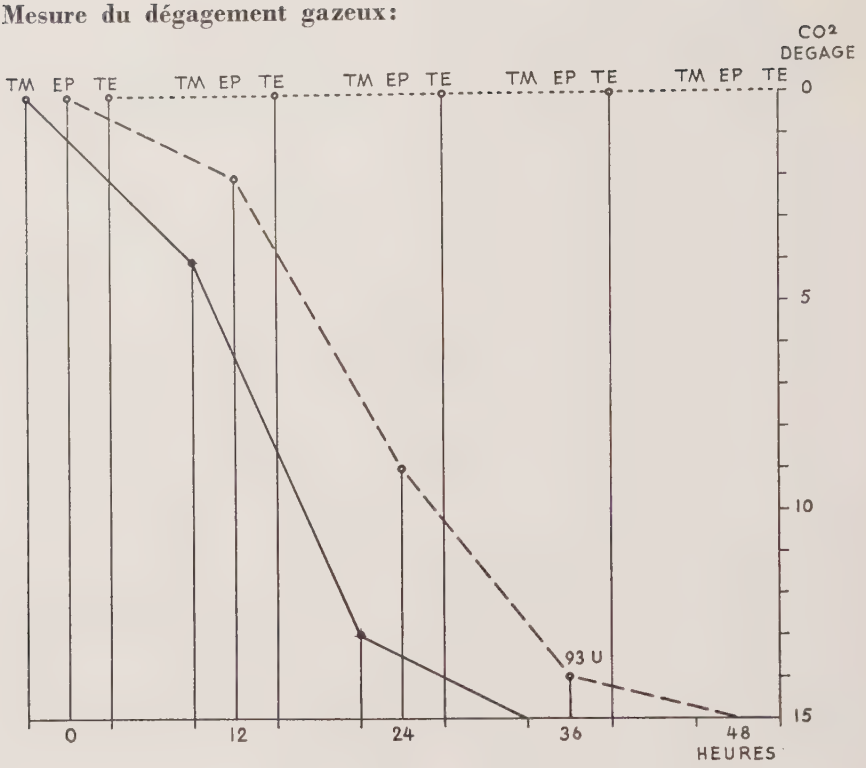


Fig. N° 21

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 2097.

Après 36 heures, le dégagement gazeux de l'extrait placentaire 2097 est de 14 /15e = 93 unités.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 1783:

Il s'agit encore d'un *extrait placentaire aqueux* dépourvu d'antiseptique, d'une concentration de 500 % d'après le fabricant. C'est un liquide limpide, incolore. La solution-mère que nous avons utilisée était de 4 %.

Dosage biophotométrique:

$$b - a = 23 - 14 = 19^{o}\ L$$
$$c - b = 87 - 23 = 64^{o}\ L$$
$$c - a = 87 - 14 = 73^{o}\ L = 100\ U.$$

donc : 64° L = 87 unités pour l'extrait 1783.

Mesure du dégagement gazeux:

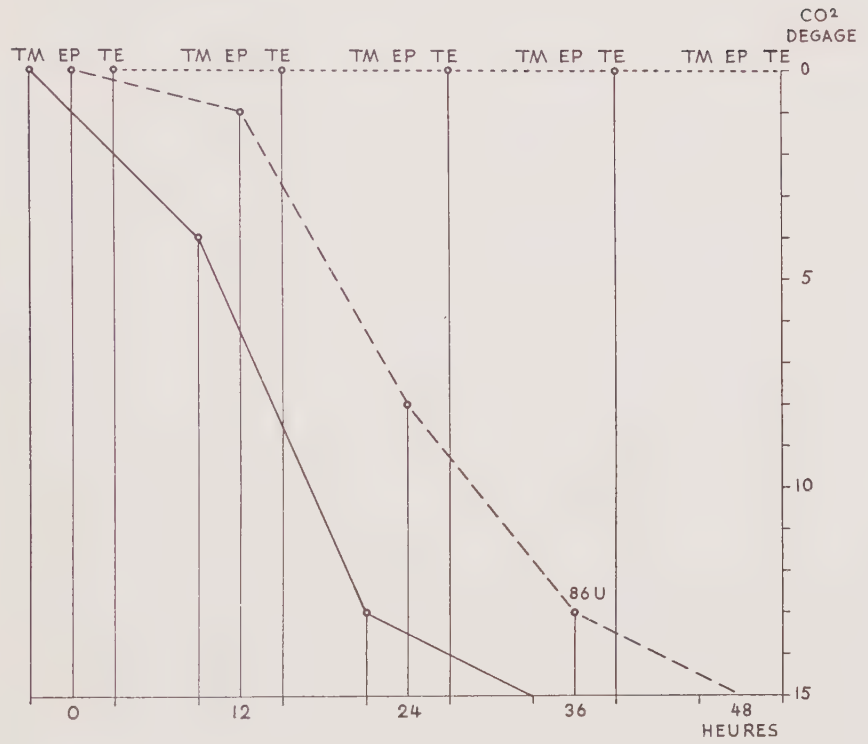


Fig. N° 22

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 1783.

Après 36 heures, le dégagement gazeux de l'extrait placentaire 1783 est de 13/15e = 86 unités.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 2300:

Il s'agit d'après le fabricant de l'*extrait* 2097 *additionné d'un antiseptique.* Nous avons donc préparé notre solution-mère de la même façon à 20 %. Nous nous attendions à ce que *le Zymomonas* ne se développe pas, vu la présence de l'antiseptique, mais nous avons pu constater une certaine croissance de la bactérie; nous pensons donc que l'antiseptique en question est peu actif vis-à-vis de la bactérie-test. Les résultats que nous avons obtenus ne peuvent par conséquent pas être considérés comme indiquant l'activité biogène intégrale de l'extrait.

Dosage biophotométrique:

$$b - a = 44 - 13 = 31^{o}\ L$$
$$c - b = 87 - 44 = 43^{o}\ L$$
$$c - a = 87 - 13 = 74^{o}\ L = 100\ U$$

donc : 43^{o} L = 59 unités pour l'extrait 2300.

Mesure du dégagement gazeux:

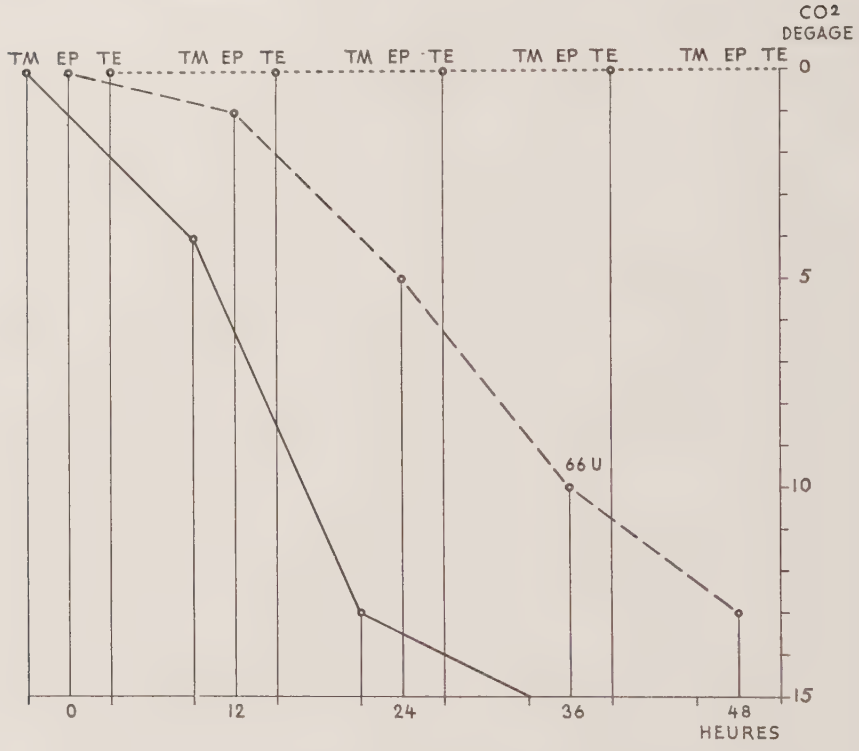


Fig. N° 23

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 2300.

Après 36 heures, le dégagement gazeux de l'extrait placentaire 2300 était de $10/15^{e} = 66$ unités.

A titre documentaire, nous rapportons ci-dessous les courbes originales enregistrées par l'appareil Bonet-Maury, où nous désignons les divers extraits de la façon suivante (Fig. 24).

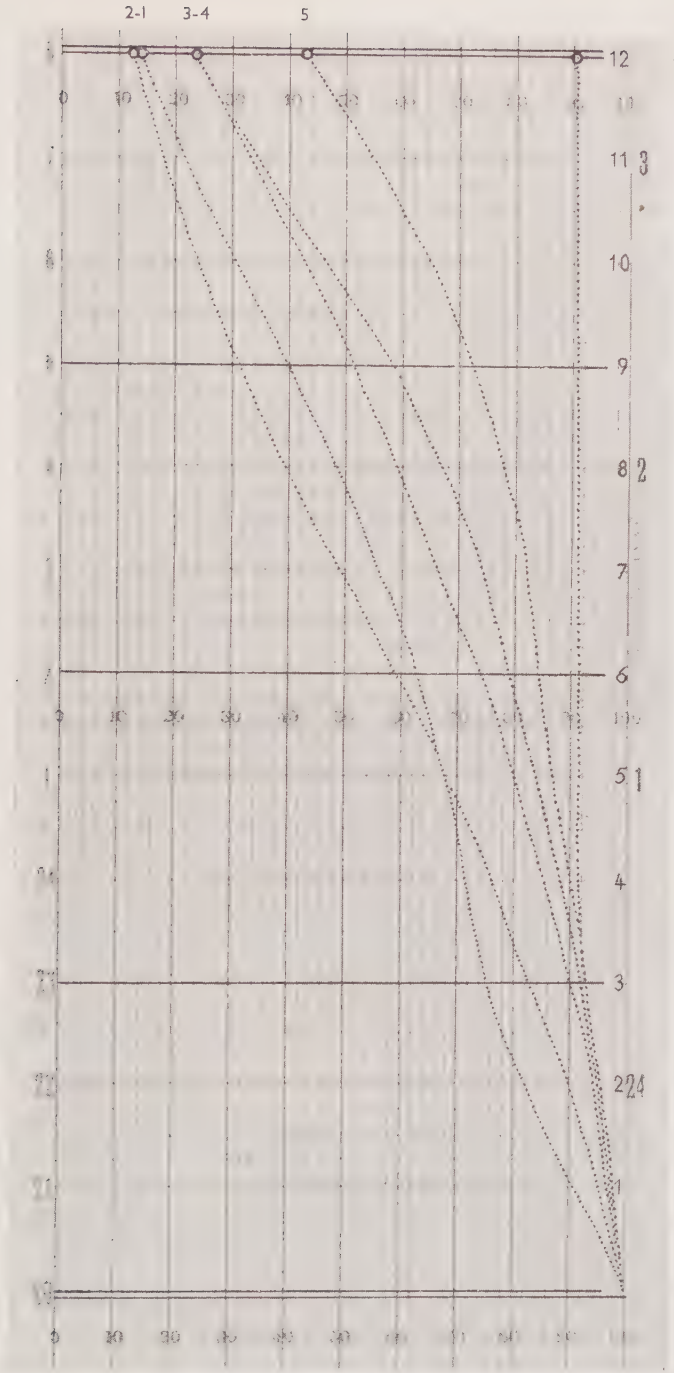


Fig. N° 21

Graphique documentaire des courbes enregistrées au Biophotomètre de Bonet-Maury, concernant deux extraits de germe de maïs et trois extraits placentaires.

Courbe N° 1 : extrait de germe de maïs à 20 % (TM)

Courbe N° 2 : extrait de germe de maïs à 20% nouvellement préparé.

Courbe N° 3 : extrait 2097

Courbe N° 4 : extrait 1783

Courbe N° 5 : extrait 2300

Courbe N° 6 : témoin eau distillée (TE).

Nous rapportons les valeurs ainsi trouvées aux extraits totaux, dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 8

Extrait N°	Solvant	Solution mère	Valeurs trouvées Unités		Valeurs calculées pour 100 % d'extrait	
			B	G	B	G
2097	eau	20 %	87	93	435	465
1783	eau.....	4 %	87	86	2165	2150
2300	eau	20 %	59	66	295	330

En comparant les deux extraits 2097 et 1783, on constate que ce dernier est sensiblement 5 fois plus fort (500 %), confirmant ainsi les indications du fabricant.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 4000 :

Il s'agit d'un *extrait placentaire en solution aqueuse*, conditionné en ampoules de 2 cc, que nous avons employé tel quel, comme solution-mère.

Dosage biophotométrique:

$$b - a = 42 - 6 = 36^{o}\ L$$

$$c - b = 92 - 42 = 50^{o}\ L$$

$$c - a = 92 - 6 = 86^{o}\ L = 100\ U$$

donc : 50^{o} L = 58 unités pour l'extrait 4000.

Mesure du dégagement gazeux:

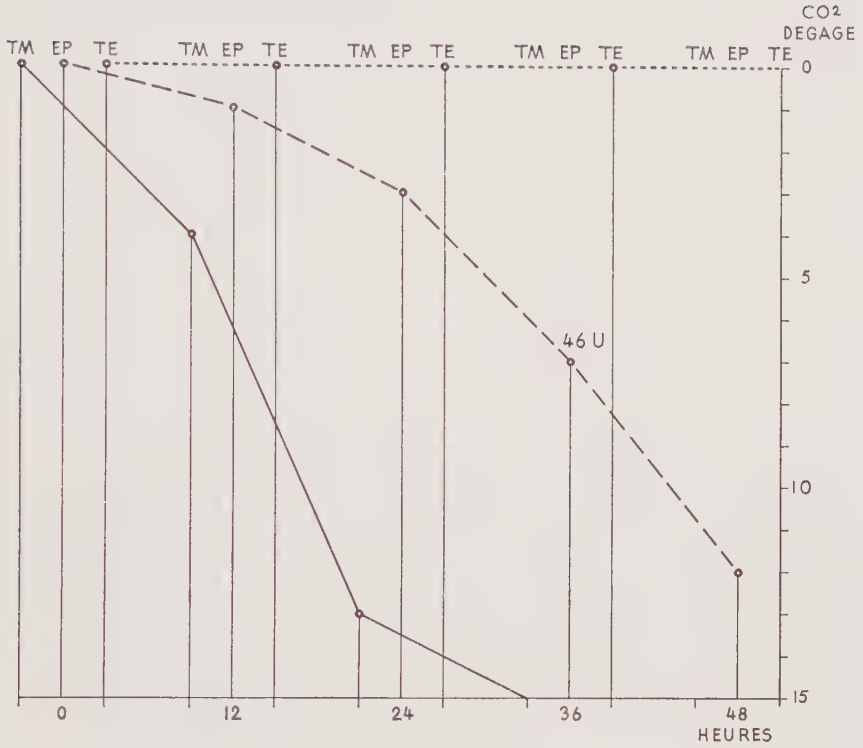


Fig. N° 25

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 4000.

Après 36 heures, le dégagement gazeux de l'extrait placentaire 4000 est de $7/15^{e} = 46$ unités.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 3100:

Cet extrait, dépourvu d'antiseptique, *est en solution aqueuse*. Il se présente sous forme d'un liquide limpide. Nous avons employé le produit conditionné comme solution-mère.

Dosage biophotométrique:

$$b - a = 46 - 6 = 40^{o}\ L$$
$$c - b = 89 - 46 = 43^{o}\ L$$
$$c - a = 89 - 6 = 83^{o}\ L = 100\ U$$

donc : 43^{o} L = 51 unités pour l'extrait 3100.

Mesure du dégagement gazeux:

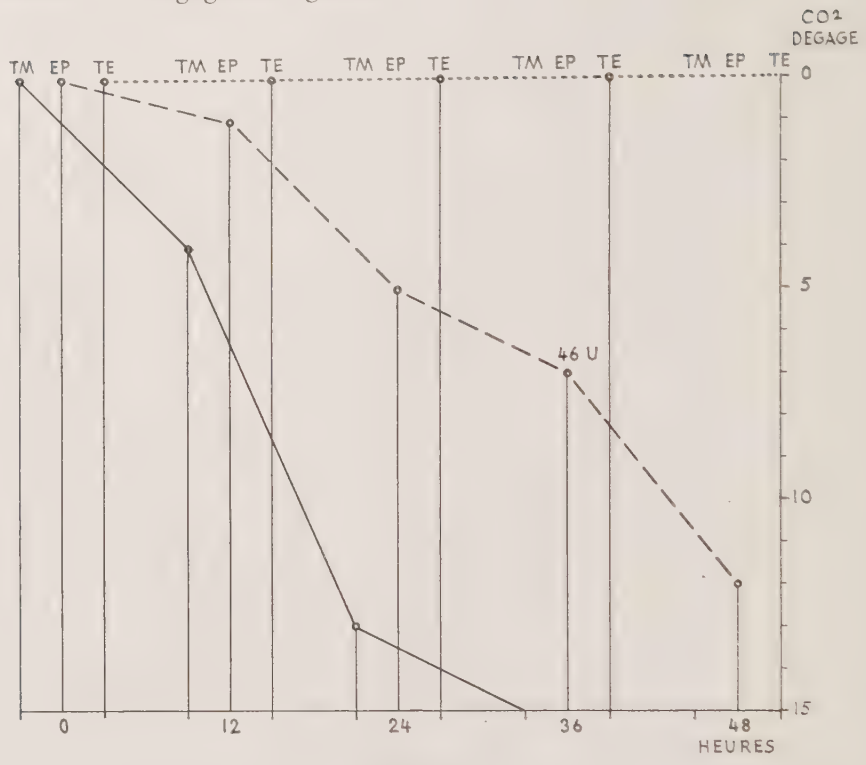


Fig. N° 26

Contrôle gazométrique de l'activité biogène de l'extrait placentaire N° 3100.

Après 36 heures, le dégagement gazeux de l'extrait placentaire 3100 était de 7/15e = 46 unités.

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 3200:

Il s'agit *du même extrait placentaire que précédemment, mais muni d'un antiseptique* d'après les indications du fabricant. Nos deux dosages nous ont montré que l'effet de l'antiseptique était tel que la croissance de *Zymomonas mobile* était pratiquement inhibée, de sorte que nos méthodes biologiques étaient impraticables.

Au cours de ces expériences, nous avons préparé *un nouvel extrait de germe de maïs pour le comparer avec notre extrait de référence fabriqué il y a deux ans et conditionné en ampoules.* Nous rapportons ci-dessous les courbes obtenues au cours de ces tests comparatifs, desquelles il ressort

qu'en employant les mêmes techniques de préparation, *on obtient des extraits biogènes à propriétés identiques.* On peut en conclure que la conservation en ampoules ne nuit pas à *la stabilité des Biostimulines, de même que les germes de maïs de différentes récoltes, mais préparés de la même façon, fournissent toujours une Biostimuline identique.*

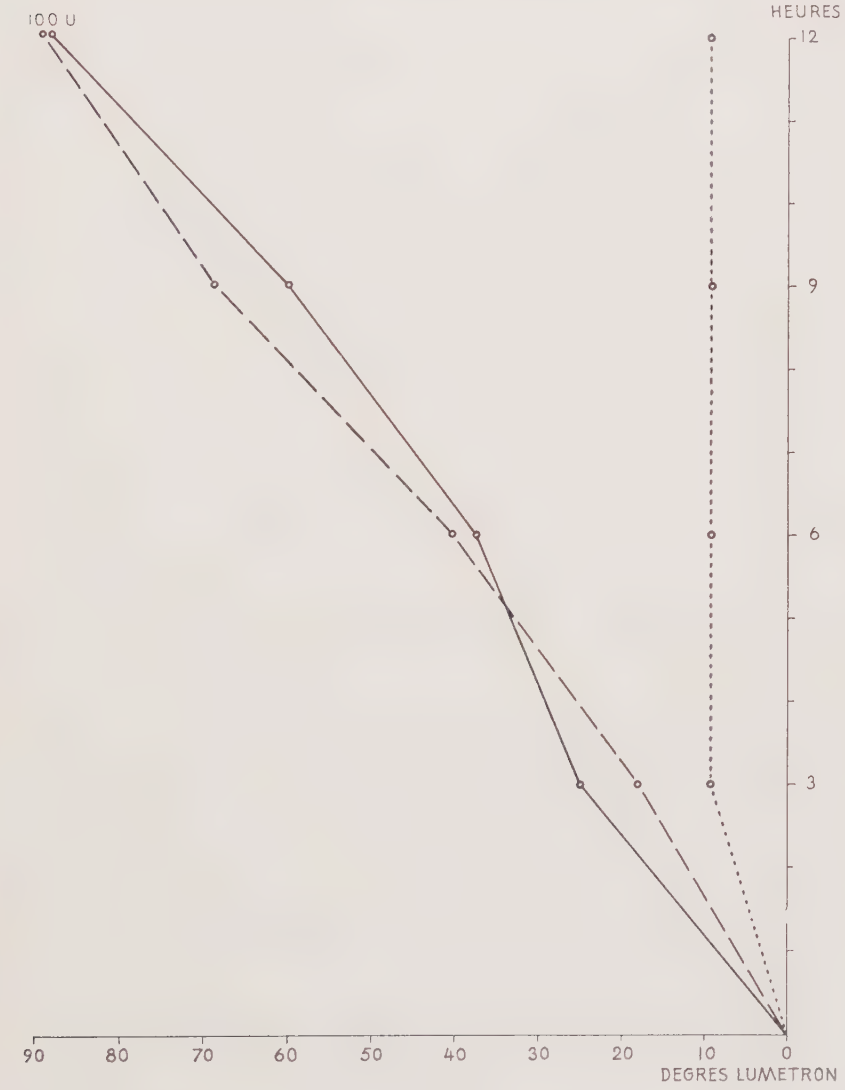


Fig. N° 28

——— TM^1
— — — — TM^2
..... TE

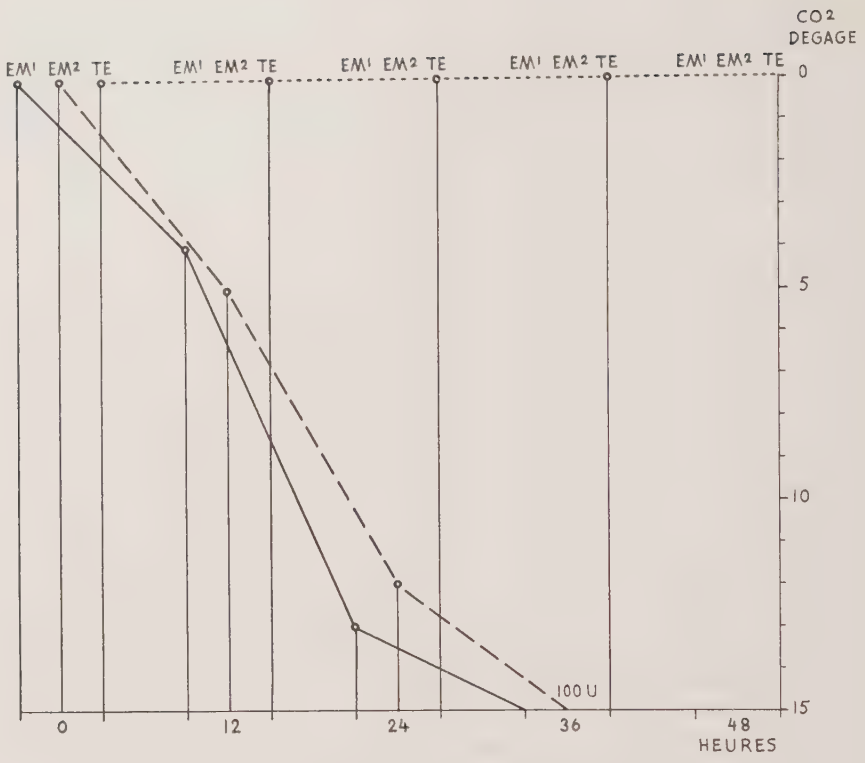


Fig. N° 29 - Graphique gazométrique

Discussion :

Comme Faudi l'a déjà démontré, notre organisme-test *Zymomonas mobile Lindner est apte* à être employé dans les conditions expérimentales que nous avons exposées *pour le dosage des extraits placentaires* préparés selon la méthode de Filatov. Faudi a apporté cette preuve au moyen de sa méthode de *mesure du dégagement gazeux*. Au cours de notre travail, nous avons pu améliorer cette technique par la préparation d'un milieu plus riche en sucre et un ensemencement plus substantiel, permettant la lecture des résultats après 36 heures.

La validité de la bactérie-test a été ensuite éprouvée par une nouvelle méthode à l'aide *du biophotomètre Bonet-Maury*, méthode qui a l'avantage d'exprimer les résultats par des courbes enregistrées automatiquement et de donner les résultats après 12 heures déjà.

Grâce à *l'extrait de germes de maïs standardisé* et admis comme 100 unités pour ces deux méthodes, nous avons pu doser un grand nombre *de produits pharmaceutiques* provenant de différents pays.

Jusqu'à présent *le dosage des Biostimulines* ne reposait pas sur des données concrètes, et l'on se contentait *de doser l'Azote total, l'Azote résiduel, les Protéines totales et les Peptides, et finalement le taux des Phosphatases acides et alcalines.* Ces valeurs n'ont naturellement aucun rapport direct avec *l'activité biogène d'un produit* et ne permettent aucune comparaison entre *les Biostimulines fabriquées* par les diverses Maisons.

Nos techniques nous ont d'autre part permis de mettre en évidence que *les Biostimulines sont totalement solubles dans l'eau*, de sorte qu'on peut les extraire facilement des préparations à base de solvants organiques ou d'excipients lipidiques.

Nos deux méthodes biologiques ont donné des résultats à peu près comparables, de sorte que l'on peut se servir de l'une ou de l'autre à titre de contrôle. Le seul inconvénient que nous avons rencontré est la présence éventuelle *d'antiseptiques ou d'antibiotiques hydrosolubles, inhibant le développement de l'organisme-test.*

Contrôle de l'activité biogène par la méthode en boîtes de Pétri :

Pour terminer, nous voudrions illustrer par quelques photos la valeur de la méthode que nous avons mise au point à l'aide *de boîtes de Pétri munies d'un substrat au moût de bière glucosé gélosé et, comme indicateur de pH, la teinture de Tournesol.* Pour les détails, nous renvoyons au Chapitre III.

Les photos que nous reproduisons montrent que cette méthode peut être considérée comme semi-quantitative. Nous avons introduit dans les réservoirs les solutions-mères *des différents extraits* contrôlés par les méthodes biophotométrique et gazométrique.

Pour l'interprétation, il ne faut pas tenir compte des plages irrégulières qui se sont formées autour du réservoir et sont dues aux craquelures de la gélose sous l'influence du CO^2. Il faut considérer l'importance de la plage formée par le virage de l'indicateur de pH et due à *la diffusion des Biostimulines* dans la couche gélosée, *le développement du Zymomonas étant en rapport direct avec cette diffusion.*

On voit que cette plage est absolument identique pour les boîtes N° 1 et N° 13 contenant les deux extraits de germe de maïs. Citons comme autre exemple la boîte N° 5 où nous avions affaire à l'extrait placentaire 0368 (*activité biogène la plus importante*, selon nos dosages antérieurs) ; on voit que la plage s'étend sur presque toute la boîte de Pétri. Par contre la zone de virage est très faible dans les boîtes N^{os} 3 et 7, concernant les extraits 0367 et 0369 qui ont montré une activité biogène très réduite par nos deux méthodes biologiques.

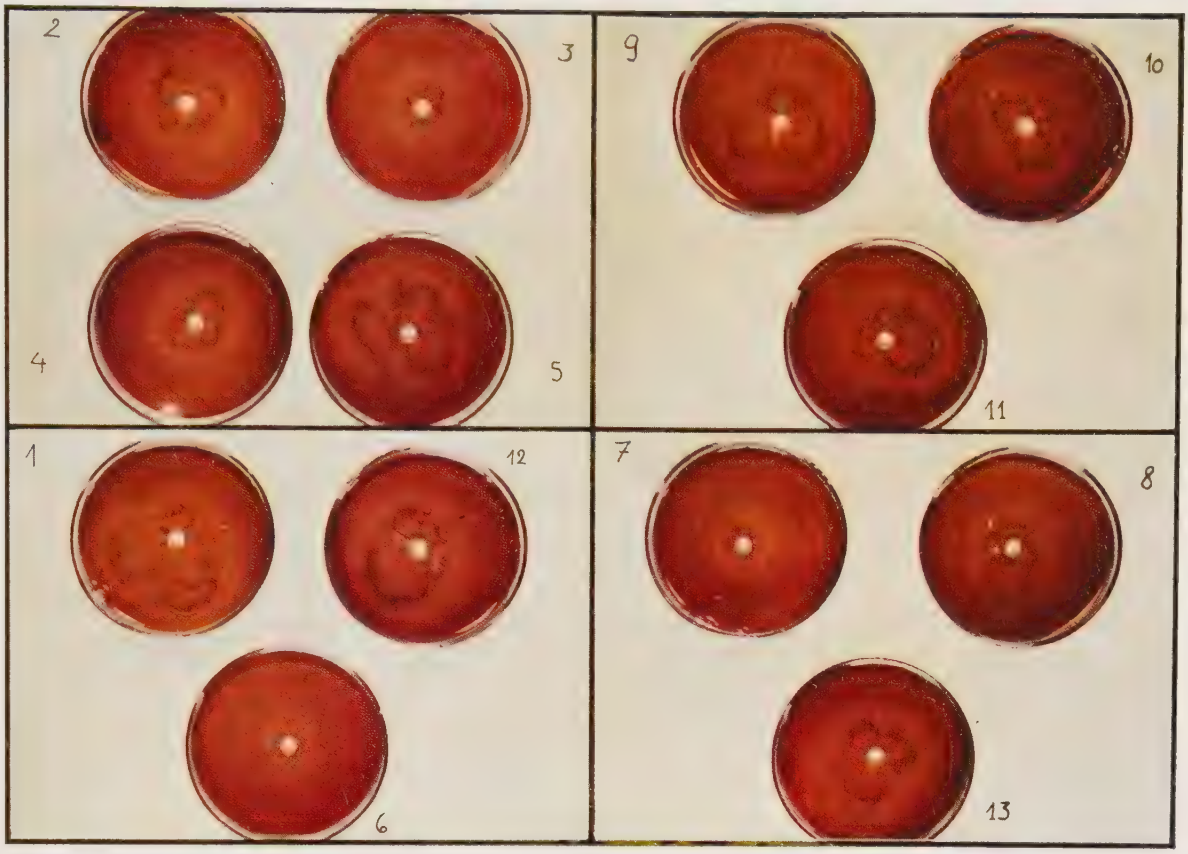
On voit ainsi que *cette méthode en boîtes de Pétri* peut rendre des services pour contrôler *l'activité des extraits de* Filatov autant lors de la préparation que lors du contrôle de laboratoire.

Le numérotage des boîtes est le suivant :

N° 1 : extrait de germe de maïs à 20 % (TM)
N° 2 : extrait placentaire 0365
N° 3 : extrait placentaire 0367
N° 4 : extrait placentaire 0368
N° 5 : extrait placentaire 0371
N° 6 : témoin à l'eau distillée (TE)
N° 7 : extrait placentaire 0369
N° 8 : extrait placentaire 3100
N° 9 : extrait placentaire 2097
N° 10 : extrait placentaire 1783
N° 11 : extrait placentaire 2300
N° 12 : extrait placentaire 0466
N° 13 : extrait de germe de maïs à 20 % nouvellement préparé par nous.

Fig. N° 27

Planche illustrant l'activité biogène de différents extraits animaux et végétaux contrôlée par notre méthode en boîtes de Pétri. →


2
3
4
5
9
10
11
1
12
6
7
8
13

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Notre travail ayant trait à l'étude *des extraits placentaires* préparés d'après la technique de FILATOV, nous avons pris comme base les travaux antérieurs effectués par BURLET, MEYER et FAUDI utilisant le *Zymomonas mobile Lindner* pour le dosage de *l'activité biogène de ces extraits par des méthodes biologiques*. La sensibilité aux biocatalyseurs, qui constitue un caractère spécifique de cet organisme, a été soupçonnée par BURLET et prouvée ensuite par FAUDI: en effet, *la croissance de ce germe est en rapport direct avec le taux de Biostimulines* présent dans son substrat nutritif.

Dans la partie historique de notre travail, nous avons tenu à exposer les propriétés morphologiques, biologiques et biochimiques de *Zymomonas mobile Lindner*.

Un autre chapitre a trait à l'étude des *Biostimulines d'origine végétale ou animale;* nous insistons particulièrement sur leur définition, telle qu'elle a été formulée tout d'abord par FILATOV et ensuite par GATE et VACHER et qui a permis de les différencier nettement des facteurs de croissance et des vitamines.

La thérapie humaine a actuellement recours surtout *aux Biostimulines contenues dans des extraits placentaires*. Les résultats thérapeutiques et expérimentaux ont éclairé d'un jour nouveau certains problèmes de pathologie et de biologie. *Les extraits placentaires* sont particulièrement employés aujourd'hui dans le traitement de certaines maladies de *dermatologie, d'ophtalmologie, de tuberculose, des ulcères gastriques, des ulcères variqueux, etc.*

On a essayé de déterminer l'activité de *ces extraits placentaires* par le *dosage chimique* des différents composants, par le contrôle de l'échange gazeux d'oxydo-réduction et par des épreuves d'histochimie. Nous rapportons les faits ainsi constatés avec suffisamment de détails pour que l'on puisse se rendre compte *qu'ils ne sont pas suffisants pour définir l'activité des Biostimulines*.

C'est pour cette raison que nos prédécesseurs ont eu recours aux *méthodes microbiologiques* et, profitant de leur expérience, nous nous sommes servi de *l'extrait de germe de maïs* à 20% comme test de référence.

Nous décrivons encore les méthodes de dosage en indiquant les milieux spécifiques pour *la culture de Zymomonas mobile* et nous donnons la description *du biophotomètre de* BONET-MAURY qui nous a servi au cours de notre travail.

Nos travaux personnels ont débuté par une série d'expériences préliminaires ayant pour but de mettre au point *le dosage des Biostimulines par le contrôle du dégagement gazeux* utilisé par FAUDI et que nous avons modifié pour ramener sa durée à 36 heures seulement.

Nous avons ensuite mis au point *une méthode biophotométrique*, adaptée spécialement aux conditions culturales de *Zymomonas mobile Lindner*. Ici aussi, nous avons eu recours *au Pantothénate Assay Medium Difco* complété à 4 % de glucose et nous avons constaté que la croissance de notre bactérie-test occasionne un trouble directement proportionnel au développement, que l'on peut mesurer au moyen de la cellule photoélectrique. De plus, ce développement est *en rapport direct avec la dose de Biostimulines* introduite dans le milieu.

Les différentes photos que nous reproduisons illustrent les modifications techniques que nous avons dû apporter *au montage du biophotomètre*, ceci pour garantir une température et un dégagement de gaz stables et toujours contrôlables.

Finalement, nous décrivons *une troisième méthode semi-quantitative* que nous avons pu mettre au point pour apprécier l'activité d'un facteur biogène. Pour cette méthode, nous avons constaté qu'il fallait employer un milieu *au moût de bière glucosé, gélosé et muni d'un indicateur de pH* (teinture de Tournesol). Cette méthode se pratique *en boîtes de Pétri* et est basée sur les principes de la technique de l'*Oxford-cup*. On apprécie *le taux de Biostimulines* par le développement bactérien amenant le virage de l'indicateur sur une plage dont l'étendue est sensiblement *proportionnelle au taux de Biostimulines*. Cette méthode, très pratique pour l'usage courant dans *l'industrie pharmaceutique*, mériterait d'être perfectionnée.

Après avoir mis nos méthodes au point, nous donnons les explications nécessaires pour l'interprétation *des résultats biophotométriques et gazométriques* que nous exprimons graphiquement.

Le but essentiel de notre travail était de contrôler l'activité biogène de divers produits pharmaceutiques. Nous avons ainsi examiné 14 extraits placentaires provenant de *laboratoires suisses, italiens et allemands ;* comme FAUDI avait déjà dosé les produits biogènes *du marché français*, nous n'avons pas jugé utile d'y revenir, mais au début nous y avons eu recours comme test de comparaison.

Les techniques gazométrique et biophotométrique nous ont permis de mettre en évidence que *les Biostimulines* sont quantitativement solubles dans l'eau, de sorte qu'on peut les extraire facilement des préparations à base de solvants organiques ou d'excipients lipidiques. Ces deux méthodes biologiques ont donné des résultats sensiblement comparables, permettant ainsi de se servir de l'une ou de l'autre à titre de contrôle.

Grâce à ces dosages, nous avons pu sélectionner parmi *les produits*

pharmaceutiques biogènes examinés, un certain nombre hautement actif, alors que d'autres présentent une activité biogène beaucoup moindre.

Le seul inconvénient pour nos méthodes biologiques est la présence d'antiseptiques ou d'antibiotiques hydrosolubles dans le produit à examiner, inhibant le développement de l'organisme-test. Nos trois méthodes se prêtent pour cette raison tout particulièrement au contrôle des fabrications industrielles des médicaments biostimulateurs, où l'analyse est possible avant l'addition d'autres produits médicamenteux ou antimicrobiens.

Il ressort de nos expériences que *les Biocatalyseurs végétaux* présentent une activité aussi forte et aussi stable que *les Biostimulines d'origine animale* et mériteraient d'entrer dans l'arsenal thérapeutique des plaies et autres lésions atones.

BIBLIOGRAPHIE

(6) Association Vitamines Chemists — Methods of Vitamin Assay, Interscientia Publishers, New York, 1947.

(13) Bischoff H. — Ophtalmologika, 1952, N° 2, suppl.

(11) Boros B., Mehes G. et Arato M. — Klin. Monatsbl. Augenheilkunde, 1951, 118, 308.

(5) Burlet E. — Schweiz. Zeit. für allg. Path. und Bakt., 1950, vol. sép. 13, fasc. 5.

(2) Burlet E., Meyer J. et Faudi J.-G. — Bull. Ac. Méd., 1955, N° 23-24, p. 407.

(4) Delaunoy E. — Le Concours Médical, 1952, 74, N° 20, 1853.

(15) Dempsey et Wisloki. — Amer. Journ. Anat., 1947, 80, 1.

(26) Durrer P. — *Influence de l'acide pantothénique sur le complément et les anticorps spécifiques. A propos de la vaccination tétanique et T.A.B.* Thèse Doct. Pharm., Strasbourg, 1959.

(22) Entner et Doudoroff. — Journ. Biol. Chem., 1952, 196, 853.

(3) Filatov. — Archives d'Ophtalmologie, 1948, 8, 345.

(18) Freytag. — Filatov's Gewebstherapie II, Die Pharmazie, 1954, 9.

(10) Gate J. et Vacher R. — *La thérapeutique tissulaire.* Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Masson, Paris, 1952, 4, fasc. 12-120 B 10.

(20) Gibbs et Demoss. — Journ. Biol. Chem., 1954, 207, 689.

(8) Kluyver A.-J. et Hoppenbrouwers W.-J. — Arch. f. Mikrobiol., 1931, B. II.

(16) Kühts E.-H. et Wirbatz. — Deutsches Gesundheitswesen, 1956, 39, 118.

(9) Lehmann et Neumann. — Bakteriol. Diagnostik, Lehmann's Verlag, München, 1927, p. 507.

(19) Lindner P. — Atlas mikr. grund. Gärungskunde, Leipzig, 1928, 3e édit. Vol. 2, Tabl. 68.

(12) Moginier. — Ophtalmologika, 1949, N° 4 suppl.

(21) Nicol Hugh. — Production of Ethenol by Agencies other than yeast, Brewer's Guild Journ. 1950, p. 354.

(14) Rauch S., Zender R. et Koestlin A. — Helv. Med. Acta, 1956, 75, 1.

(24) Romond Ch., Sartory R., Meyer J. et Malgras J. — *La mise en évidence des cils bactériens. Étude d'une méthode de coloration.* Bull. Assoc. Dipl. Microbiol. Nancy, 1959, 75.

(1) Schopfer W.-H. — Arch. Mikrobiol., 1935, 5, 513; 1937, 8, 244.

(25) Skeggs et Wright. — Journ. Biol. Chem., 1944, 156, 21.

(7) Welsch A.-M. — *Le dosage microbiologique des vitamines*. Éd. Desoer, Liège, 1947.

(23) Zettnow. — Zeitschr. für Hygiene, 1928, 85, 17.

(17) Zumach. — Deutsches Gesundheitswesen, 1953, 15.

Vu, Strasbourg, le 18 mai 1961

Le Président du Jury,

R. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 23 mai 1961

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

P. DUQUÉNOIS

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 30 mai 1961

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

J. F. ANGELLOZ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 8

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Historique de la Thérapie par les extraits placentaires 9

Propriétés biologiques des extraits placentaires de FILATOV 10

Étude biochimique des extraits placentaires 12

Définition d'un extrait placentaire 14

CHAPITRE II

Méthodes Microbiologiques de dosage des Biostimulines 17

Description de Zymomonas mobile Lindner 17

Méthode de coloration des cils 19

Autres propriétés biochimiques de Zymomonas mobile Lindner 21

Bacto Pantothenate Assay Medium Difco 21

Milieu au moût de bière 23

Description de l'appareil Bonet-Maury 23

Mesure du dégagement gazeux au moyen du tube de Besson modifié ... 26

Méthode de contrôle au moyen des boîtes de Pétri 27

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

Expériences préliminaires 29

Dosage des Biostimulines par le contrôle du dégagement gazeux 29

Méthode biophotométrique 30

CHAPITRE IV

Dosage de divers extraits placentaires 37

Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0366 42
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0367 43
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0369 44
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0466 46
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0368 47
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 0370 47
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 2097 53
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 1783 54
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 2300 55
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 4000 58
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 3100 59
Contrôle de l'activité biogène de l'extrait placentaire 3200 60
Discussion 62
Contrôle de l'activité biogène par la méthode en boîtes de Pétri 63

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 65

BIBLIOGRAPHIE 68

Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg - Dépôt légal: N° 1064/1961